

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Nina Kosi**

**Diferencijacija i sinaptičko povezivanje  
živčanih matičnih stanica  
transplantiranih u mozak miša  
zahvaćen ishemijom**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2015.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Nina Kosi**

**Diferencijacija i sinaptičko povezivanje  
živčanih matičnih stanica  
transplantiranih u mozak miša  
zahvaćen ishemijom**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2015.**

Disertacija je izrađena na Institutu za istraživanje mozga te Zavodu za histologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: doc. dr. sc. Dinko Mitrečić

Zahvaljujem svom mentoru doc. dr. sc. Dinku Mitrečiću na razumijevanju i podršci u cjelokupnom radu. Posebno hvala Ivanu, Mariji i Katarini na brizi i vrijednim savjetima. Također zahvaljujem svim zaposlenicima Laboratorija za neurogenetiku i razvoj pod vodstvom prof.dr.sc.Srećka Gajovića na ustrajnoj i stručnoj potpori.

I za kraj hvala mojoj obitelji na strpljenju.

## POPIS OZNAKA I KRATICA

MS – matične stanice

ESC – embryonic stem cell, hrv. embrionalna matična stanica

FGF – fibroblast growth factor, hrv. fibroblastni čimbenik rasta

TGF – transforming growth factor, hrv. transformirajući čimbenik rasta

EGC – embryonic germ cell, hrv. embrionalna zametna stanica

ŽMS – živčana matična stanica

ASC – adult stem cell, hrv. adultna matična stanica

MSC – mesenchymal stem cell, hrv. mezenhimalna matična stanica

HSC – hematopoietic stem cell, hrv. hematopoetska matična stanica

GFP – green fluorescent protein, hrv. zeleni fluorescentni protein

YFP – yellow fluorescent protein, hrv. žuti fluorescentni protein

DNA – deoxyribonucleic acid, hrv. deoksiribonukleinska kiselina

MCA – middle cerebral artery, hrv. srednja cerebralna arterija

MCAO – middle cerebral artery occlusion, hrv. okluzija srednje cerebralne arterije

GFAP – glial fibrillar acidic protein, hrv. glijalni fibrilarni kiseli protein

UCMSC – umbilical cord mesenchymal stem cell, hrv. umbilikalna mezenhimalna matična stanica

MNC – mononuclear cell, hrv. mononuklearna stanica

NIH – National Institute of Health, hrv. Nacionalni institut za zdravlje

PBS – phosphate buffered saline, hrv. puferirana otopina soli

BrdU – bromodeoxyuridine, hrv. bromodeoksiuridin

SDS – sodiumdodecylsulphate, hrv. natrijdodecilsulfat

# SADRŽAJ

<b>1. Uvod</b>	1
1.1. Matične stanice	1
1.1.1. Izvori matičnih stanica	1
1.1.2. Terapijska primjena matičnih stanica	5
1.1.3. Diferencijacija živčanih matičnih stanica u neurone i sinaptogeneza	7
1.2. Obilježavanje matičnih stanica	8
1.3. Moždani udar i animalni modeli	9
1.4. Reaktivne postishemijske promjene u tkivu	11
1.4.1. Reaktivna glijoza	11
1.4.2. Angiogeneza	11
1.4.3. Reakcija aksona na ozljedu	12
1.5. Kliničke studije primjene matičnih stanica u liječenju moždanog udara	13
1.5.1. Objavljene kliničke studije	13
1.5.2. Registrirane kliničke studije	14
<b>2. Hipoteza i cilj rada</b>	17
2.1. Hipoteza	17
2.2. Cilj rada	17
2.2.1. Opći cilj	17
2.2.2. Specifični ciljevi	17
<b>3. Uzorci i postupci</b>	19
3.1. Pokusne životinje	19
3.2. Postupci sa životinjama	19
3.2.1. Uzgoj i smještaj životinja	19

3.2.2. Razmnožavanje životinja .....	20
3.2.3. Žrtvovanje životinja .....	20
3.2.4. Određivanje dobi zametka .....	21
3.2.5. Postupci sa životinjama.....	21
3.3. Postupci sa stanicama .....	25
3.3.1. Izolacija živčanih matičnih stanica .....	25
3.3.2. Uzgoj neurosfera .....	26
3.3.3. Priprema stanica za pokuse <i>in vitro</i> .....	26
3.3.4. Priprema stanica za pokuse <i>in vivo</i> .....	30
3.4. Postupci s tkivima.....	31
3.4.1. Izolacija i fiksacija tkiva .....	31
3.4.2. Priprema histoloških preparata .....	31
3.4.3. Bojenje prema Nisslu .....	31
3.4.5. Imunohistokemija .....	32
<b>4. Rezultati .....</b>	<b>35</b>
4.1. In vitro karakterizacija živčanih matičnih stanica .....	35
4.1.1. Proliferacijski potencijal živčanih matičnih stanica .....	35
4.1.2. Diferencijacijski potencijal živčanih matičnih stanica.....	36
4.1.3. Sinaptički potencijal živčanih matičnih stanica .....	40
4.2. Obilježavanje embrionalnih živčanih matičnih stanica i utjecaj obilježavanja na njihova svojstva .....	48
4.2.1. Obilježavanje živčanih matičnih stanica bojom PKH26 te njihova karakterizacija .....	48
4.2.2. Obilježavanje živčanih matičnih stanica BrdU-om te njihova karakterizacija .....	49
4.3. Transplantacija živčanih matičnih stanica u oštećeno i zdravo tkivo.....	52
4.3.1. Transplantacija PKH26+ živčanih matičnih stanica u oštećeno i zdravo tkivo .....	52

4.3.2. Transplantacija BrdU+ živčanih matičnih stanica u oštećeni i zdravi striatum .....	56
4.4. Reaktivne promjene u postishemijskom moždanom tkivu .....	60
4.4.1. Proliferacija astrocita (reaktivna gliosa) .....	61
4.4.2. Rast novih krvnih žila .....	61
4.4.3. Rast aksona .....	61
4.4.4. Proliferacija živčanih matičnih stanica - Nop2 kao biljeg proliferacije živčanih matičnih stanica .....	62
4.4.5. Rast izražaja sinaptičkih biljega.....	63
<b>5. Rasprava .....</b>	<b>67</b>
5.1. In vitro karakterizacija živčanih matičnih stanica .....	67
5.1.1. Proliferacijski potencijal živčanih matičnih stanica .....	67
5.1.2. Diferencijacijski potencijal živčanih matičnih stanica.....	68
5.1.3. Sinaptički potencijal živčanih matičnih stanica .....	69
5.2. Obilježavanje živčanih matičnih stanica i utjecaj obilježavanja na njihova svojstva .....	70
5.3. Transplantacija živčanih matičnih stanica u oštećeno i zdravo tkivo .....	71
5.3.1. Transplantacija živčanih matičnih stanica u corpus callosum .....	71
5.3.2. Transplantacija živčanih matičnih stanica intracerebroventrikularno .....	72
5.3.3. Transplantacija živčanih matičnih stanica u striatum .....	72
5.4. Reaktivne promjene u postishemijskom moždanom tkivu .....	73
5.4.1. Reaktivna gliosa i angiogeneza .....	73
5.4.2. Ponovni rast aksona .....	73
5.4.3. Proliferacija endogenih živčanih matičnih stanica .....	74
5.4.4. Rast izražaja sinaptičkih biljega.....	74
<b>6. Zaključci.....</b>	<b>75</b>
<b>7. Sažetak.....</b>	<b>77</b>

<b>8. Summary .....</b>	<b>78</b>
<b>9. Popis literature .....</b>	<b>79</b>
<b>10. Životopis .....</b>	<b>90</b>



# 1. Uvod

## 1.1. Matične stanice

Matične stanice (MS) su nediferencirane stanice s velikom sposobnošću proliferacije koje diferencijacijom daju niz različitih specijaliziranih vrsta stanica. Možemo ih pronaći u embrionalnom, fetalnom ili adultnom tkivu, a mogu nastati i genetskom manipulacijom diferenciranim stanicama te ih tada nazivamo induciranim pluripotentnim matičnim stanicama. Osim po podrijetlu matične stanice se međusobno razlikuju i prema broju specijaliziranih stanica koje iz njih nastaju. Tako razlikujemo embrionalne matične stanice koje imaju sposobnost formiranja svih tkiva odraslog organizma (pluripotentnost), te adultne matične stanice, koje sudjeluju u obnovi samo onih tkiva i organa u kojima su smještene (multipotentnost).

### 1.1.1. Izvori matičnih stanica

Koštana srž je najčešće korištena te prvi otkriveni izvor matičnih stanica. U njoj se nalaze hematopoetske i mezenhimalne matične stanice. Šezdesetih godina dvadesetog stoljeća, potaknuta negativnim učincima atomskih bombi, započeta su intenzivna istraživanja obnove koštene srži. Prvi pokušaji obnove oštećene srži su se zasnivali na transplantaciji mješavine tkiva i stanica iz alogene koštane srži. To su bile ujedno i prve uspješne transplantacije matičnih stanica u terapijske svrhe.[1]

Izvori matičnih stanica se mogu podijeliti u tri velike skupine:

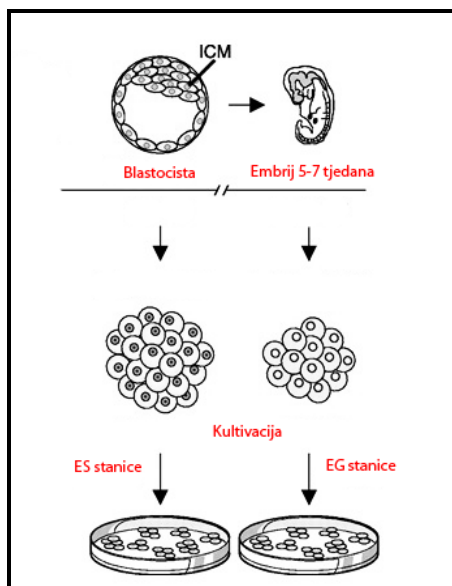
#### A. Embrionalno tkivo

Iz embrionalnog tkiva se u najranijem razvojnem stadiju mogu izolirati pluripotentne embrionalne matične stanice (ESC, *eng.* embryonic stem cells) koje imaju sposobnost formiranja svih tkiva odrasle jedinke.

ESC se izoliraju iz stadija blastociste koja se kod ljudi javlja oko pet dana nakon fertilizacije oocite. Tada se u blastocisti formira nakupina od oko 150 stanica koja se naziva „unutarnja stanična masa“ (ICM, *eng.* inner cell mass), čijim se uklanjanjem te daljnjim uzgojem u kulturi dobivaju ESC.[2] Iako ESC mogu formirati sva somatska tkiva, one ne mogu formirati ekstraembrionalna tkiva poput placente i fetalnih membrana. Zbog toga se ESC smatraju drugačijima u odnosu na totipotentnu oplodenu oocitu ili blastomerne stanice koje nastaju njenim prvim diobama.[3]

Mišje embrionalne matične stanice su prvi puta uspješno izolirane 1981.godine iz linije Sv129, no za uspješnu izolaciju ljudskih trebalo je proći još desetak godina. Prvu uspješnu izolaciju ljudskih matičnih stanica je postigao Thomson 1998. godine. Daljnja istraživanja su otkrila važne razlike u svojstvima između ljudskih i mišjih ESC, te je tako pokazano da su ljudske ESC osjetljivije na enzimatsku pasažu, a kod rasta zahtijevaju prisutnost fibroblastnog i transformirajućeg čimbenika rasta (FGF, *eng.* fibroblast growth factor, TGF, *eng.* transforming growth factor).[4,5]

Jedine stanice izolirane iz embrionalnog tkiva uz ESC koje posjeduju dokazanu pluripotentnost su embrionalne zametne stanice (EGC, *eng.* embryonic germ cells). EGC nastaju iz primordijalnih zametnih stanica te se tijekom razvoja iz njih stvaraju gamete. U većini svojstava EGC se ne razlikuju od ESC te imaju sličan proliferativni i diferencijacijski kapacitet.[6,7,8]



Slika 1. Pregled ranog embrionalnog razvoja u stadijima blastociste i embrija starosti 5-7 tjedana. U ovim stadijima mogu se izolirati pluripotentne matične stanice, u stadiju blastocite embrionalne matične stanice (ESC), a kod embrija starog 5-7 tjedana embrionalne zametne stanice (EGC) (preuzeto i prilagođeno iz [8]).

### B. Fetalno tkivo

Fetalne matične stanice su stanice smještene u svim organima fetusa. Mogu se izolirati iz fetalne krvi, koštane srži, te drugih tkiva poput jetre, bubrega ili mozga.[9] Specifične su za pojedina tkiva te služe za razvoj zrelih stanica tkiva ili organa u kojima se nalaze.

Fetalnim se razdobljem u sisavaca označava razdoblje kada je većina glavnih organa prisutna, no nije još u cijelosti razvijena, niti funkcionalna. Kod miša se obzirom na kratko vrijeme gestacije obično koristi naziv embrij za sve razvojne faze do okota.[10]

Multipotentne živčane matične stanice (ŽMS) uspješno su izolirane iz različitih regija embrionalnog mišjeg (stadij E10 na dalje) i fetalnog ljudskog mozga (8-11 tjedana postkonceptijski).[11] Embrionalne ŽMS predstavljaju heterogenu skupinu različitih matičnih i progenitornih stanica koje dijele neke zajedničke karakteristike poput proliferacijske sposobnosti te multipotentnosti.

### C. Adultno tkivo

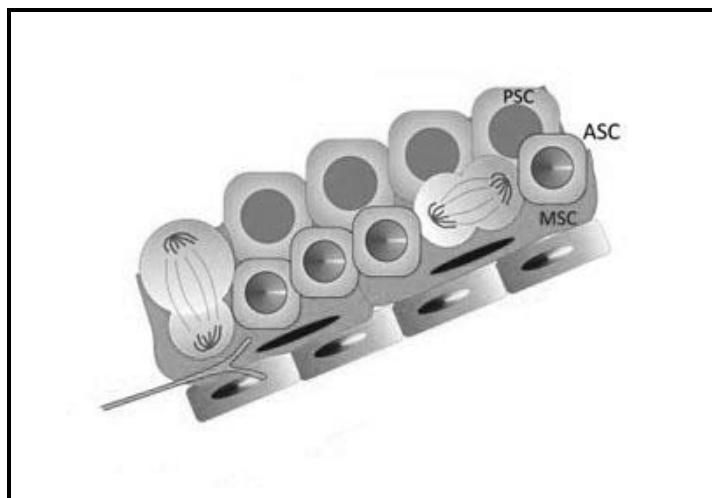
Adultne matične stanice (ASC, *eng.* adult stem cells) su nediferencirane stanice smještene u pojedinim zrelim tkivima i organima. Sposobne su umnažati se te diferencijacijom dati specijalizirane vrste stanica. Njihova je uloga održavanje i popravak tkiva u kojem se nalaze.

Do prije desetak godina jedina vrsta adultnih matičnih stanica za koje se sa sigurnošću znalo da postoje su hematopoetske matične stanice (HSC, *eng.* hematopoietic stem cell). One su stalni izvor svih zrelih krvnih stanica. Postojanje drugih vrsta ASC u proliferativnim organima poput kože ili jetre je bilo predmet rasprava, sve dok se nisu razvile metode njihove izolacije i uzgoja te dok se nisu pojavili biljezi koji nam danas omogućuju njihovo prepoznavanje.

ASC se mogu podijeliti na parenhimalne koje sudjeluju u stvaranju somatskih tkiva te mezenhimalne matične stanice (MSC, *eng.* mesenchymal stem cells) iz kojih nastaju različite vrste vezivnih tkiva poput masnog, koštanog i hrskavičnog tkiva.[12,13]

Za razliku od mezenhimalnih stanica koje su široko rasprostranjene, parenhimalne ASC se nakupljaju u organima u strukture nazvane nišama. U nišama ASC žive u stanju mirovanja ili na niskoj razini proliferacije, a potporu im pružaju MSC. Uz to u niši se nalazi specifična vaskularna i živčana opskrba.

Specifične niše su dosada najbolje opisane za ASC smještene u koštanoj srži, crijevima, koži i mozgu.[14,15]



Slika 2. Prikaz niše sastavljene od parenhimalnih i mezenhimalnih matičnih stanica s vaskularnom i živčanom potporom (preuzeto i prilagođeno iz [12]).

## **1.1.2. Terapijska primjena matičnih stanica**

### **1.1.2.1. Pregled**

Prva uspješna terapija matičnim stanicama učinjena je 1959. godine kada su Thomas i suradnici nakon supralethalne iradijacije pacijentu s leukemijom transplantirali HSC podrijetlom iz alogene koštane srži te postigli remisiju i brzi oporavak. Intenzivna istraživanja u zadnjih 50 godina omogućila su da se terapija HSC danas svakodnevno primjenjuje kao standardni način liječenja mnogih hematoloških bolesti. Svake godine se učini oko 60,000 transplantacija HSC (30,000 autolognih i 25,000 alogenih) za liječenje limfoma, mijelodisplastičnih i mijeloproliferativnih sindroma, hemoglobinopatija, urođenih metaboličkih defekata te imunodeficijencija.[1] HSC za transplantaciju se uzimaju iz koštane srži, periferne krvi ili pupkovine.

Za razliku od navedenih hematoloških bolesti kod kojih je stanična terapija u kliničkoj upotrebi već godinama, u bolestima drugih organskih sustava postupci stanične terapije još uvijek nisu u rutinskoj primjeni. U ovom trenutku se najviše istražuju bolesti za koje ne postoji dovoljno dobra/specifična terapija i bolesti za koje su matične stanice pokazale najveći potencijal poput bolesti mozga i kardiovaskularnih bolesti. Pritom su bolesti mozga najviše istraživane, budući da za moždani udar ne postoji dovoljno dobra terapija, a nepostojanje endogenog regenerativnog potencijala je uzrok dramatičnih posljedica po cijelo čovječanstvo.[16,17] Za navedene su bolesti mnogobrojne bazične studije i prve kliničke studije terapije matičnim stanicama pokazale učinkovitost.

Povoljan učinak transplantiranih stanica se objašnjava pomoću nekoliko različitih mehanizama. Naime, transplantirane stanice mogu djelovati protektivno na ozlijeđeno tkivo putem izlučivanja niza trofičkih faktora kojima smanjuju upalu te potiču proliferaciju endogenih progenitora. Osim toga diferencijacijom na mjestu ozljede mogu se razviti u zrele stanice i nadomjestiti izgubljeno tkivo.

### **1.1.2.2. Primjena matičnih stanica u ishemijskom moždanom udaru**

Ishemija moždanog tkiva uključuje niz patofizioloških događaja koji dovode do nekroze i propadanja raznih stanica, neurona ili glije, u manjem ili većem području mozga. Za uspješan oporavak postishemijskog tkiva je potrebno nadoknaditi ne samo odumrle neurone, nego i gliju, te uspostaviti novi optok krvi.

Dosadašnja istraživanja ispitivala su učinkovitost različitih matičnih/progenitornih stanica u terapiji moždanog udara, a dobiveni rezultati u eksperimentalnim studijama kao i u inicijalnim kliničkim studijama su obećavajući.[18]

Matične stanice su u navedenim studijama transplantirane na različite načine: intravenski, intraarterijski i intracerebralno.[19,20,21] Intravenski i intraarterijski pristup dovode relativno malen broj stanica u područje ozljede, i to uglavnom u penumbri, a intravenski put osim toga pokazuje i značajno nakupljanje stanica u plućnim krvnim žilama. Zasad nije jasno u kojoj mjeri nakupljanje MS u plućima i ostalim perifernim organima poput slezene ili bubrega doprinosi zamijećenom povoljnom učinku intravenske transplantacije u nekim studijama, a u kojoj mjeri predstavlja potencijalno opasnu komplikaciju.[21, 22]

Intracerebralna transplantacija u odnosu na intravensku i intraarterijsku omogućava dopremu daleko većeg broja stanica u sam parenhim te na taj način otvara prostor za mnogo jači terapijski učinak.[23]

Ono što još uvijek nije poznato jest koje je mjesto unutar moždanog parenhima najbolje za transplantaciju. Tako su u nekim istraživanjima stanice transplantirane u samo mjesto ozljede, u nekima malo dalje, a u nekima čak i u suprotnu hemisferu. Rezultati navedenih istraživanja su međusobno različiti te je njihova usporedba otežana činjenicom da su provedena u različitim uvjetima.

Osim mjesta za postizanje najboljeg mogućeg učinka stanične terapije važan je i izbor transplantiranih stanica. Dosada su najčešće transplantirane mezenhimalne, mononuklearne stanice koštane srži te fetalne ŽMS.

Mehanizam povoljnog učinka transplantiranih stanica nije sasvim poznat obzirom da su u nekim studijama koje su zabilježile pozitivan učinak stanice preživljavale i integrirale se, a u drugim ih se u tkivu nije moglo pronaći.[24,25,26] Prema tome najvjerojatnije se radi o njihovom mogućem dvojakom učinku trofičkom/imunomodulatornom te djelovanju kroz diferencijaciju i integraciju u tkivo. Stanice koje imaju najbolje preduvjete za takav dvojaki učinak su ŽMS budući da uz sposobnost trofičkog djelovanja mogu i diferencijacijom dati zrele živčane stanice.

### **1.1.3. Diferencijacija živčanih matičnih stanica u neurone i sinaptogeneza**

Živčane matične stanice svojom diferencijacijom stvaraju zrele tipove stanica: neurone i gliju. Iako ovo zbivanje nije do kraja istraženo vjeruje se da potpuno sazrijevanje novostvorenih neurona nastupa jedino ako se oni međusobno sinaptički povežu. Stoga se proces sinaptogeneze smatra posljednjim korakom u razvoju neurona.

Sinaptogeneza je složen proces koji se odvija u nekoliko glavnih faza. U prvoj fazi se inducira stvaranje sinapsi nakon uspostave međustaničnog kontakta. Na mjesto budućih sinapsi se potom privuku i ostali sinaptički proteini koji pomažu u daljnjoj izgradnji. Zadnja faza traje najdulje, a tijekom nje se odvija postepeno sinaptičko sazrijevanje.[27]

Temeljem opisanog, prvi stadij nastanka sinapse je uspostavljanje kontakta između presinaptičkog aksona i postsinaptičkog dendrita, tijela neurona ili aksona. Kontakt može biti potaknut od strane aksona ili dendrita. Iako se prije smatralo da je proces sinaptičke indukcije stohastički događaj koji se može dogoditi bilo gdje duž aksona ili dendrita, novija istraživanja su pokazala da sinaptička indukcija nastupa na točno predefiniranim mjestima.[28] Na dendritu takva mjesta čine stabilni kompleksi sinaptičkih proteina: neuroligina, PSD95, Shank i GKAP koji imaju sposobnost inducirati formiranje presinaptičkog terminala, a na aksonima sinaptički mjehurići koji oslobađajući neurotransmitore privlače i stabiliziraju dendritske filopodije.

Nakon prve faze sinaptičke indukcije dolazi do postepenog nakupljanja i ostalih proteina na tim mjestima. Temeljem dosadašnjih istraživanja predlagani su različiti načini kojima bi se taj proces mogao odvijati, a Washbourne i suradnici su pokazali da je zapravo riječ o paralelnom procesu

nakupljanja presinaptičkih i postsinaptičkih proteina koji se odvija unutar desetak minuta.[29] Za razliku od prve dvije faze, treća faza u sinaptičkoj izgradnji - sazrijevanje predstavlja dugotrajan proces tijekom kojeg postepeno rastu presinaptički i postsinaptički proteinski kompleksi.

## 1.2. Obilježavanje matičnih stanica

Stanični obilježivači se mogu podijeliti na egzogene, koje čine različite kemikalije sposobne reagirati sa staničnim komponentama te na endogene koje čine fluorescentni proteini konstitutivno proizvedeni u ciljnim stanicama.

### Endogeni obilježivači

Zeleni fluorescentni protein (GFP, *eng.* green fluorescent protein) potječe iz meduze te predstavlja najčešće korišteni fluorescentni obilježivač. [30] Niz dosadašnjih istraživanja rađeno je na transgeničnim miševima i zebricama s ekspresijom GFP-a u specifičnim staničnim linijama ili cijelim tkivima.

Osim zelenog istraživači su uspjeli proizvesti i različite fluorescentne varijante: cijan, plavu i žutu. Istovremeno, iz tropskih koralja je uspješno izoliran crveni fluorescentni protein.

Posebna vrsta transgenične životinje koja konstitutivno eksprimira žuti fluorescentni protein (YFP, *eng.* yellow fluorescent protein) u jednom dijelu neurona je B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J linija koju smo i mi koristili u našem istraživanju. Ova linija izražava YFP u motornim i senzornim neuronima kao i dijelu centralnih neurona.[31,32,33,34] Izražaj YFP-a je određen regulatornim elementima Thy1 gena. Thy1 (CD90) je glikoprotein normalno prisutan u mnogim stanicama sisavaca, osim neurona, u timocitima, T stanicama, endotelnim stanicama te fibroblastima. Egzon 3 potreban za izražaj Thy1 u ne-neuralnim stanicama je u ovoj liniji uklonjen te je zasad fluorescentni YFP signal zabilježen izvan živčanog sustava jedino u Thy1-aktivacijskim uvjetima poput upale.[35]



Osim transgenične ekspresije ona se može postići i pomoću transdukcije djelovanjem lentivirusa ili transfekcijom plazmida.[36]

### Egzogeni obilježivači

Egzogeni obilježivači su boje u kojima se inkubiraju stanice neposredno prije transplantacije i za koje se očekuje da taj signal zadrže u nekom vremenskom periodu. Iako je takav postupak označavanja razmjerno jednostavan, egzogeni označivači su potencijalno toksični, pa je prije svakog istraživanja potrebno ispitati titar razrjeđenja u kojem se dobiva najbolji učinak, bez odumiranja stanica. Također, očit nedostatak je da uslijed stanične proliferacije dolazi do brzog slabljenja signala. Prema dijelu stanice za koje označivači imaju afinitet, razlikujemo citoplazmatske, nuklearne i membranske boje.

Nuklearne boje s visokim afinitetom za dvostruku DNA omogućavaju jaki nuklearni signal, međutim mogu utjecati na fundamentalne biološke procese poput DNA replikacije i transkripcije te uzrokovati oštećenje DNA.[37]

Membranske boje su lipofilne te se svojim alifatskim dijelom vežu za lipidni dvosloj i čini se imaju manju citotoksičnost nego citoplazmatske i nuklearne boje.[38] PKH boje poput PKH67, PKH3 i PKH26 su dosada naveliko korištene u praćenju limfocita. Bojaju membranu lateralnom difuzijom, te se šire i u intracelularne organele zbog membranske razgradnje.

## **1.3. Moždani udar i animalni modeli**

Moždani udar je jedan od najvećih zdravstvenih problema čovječanstva. Razlog tome je iznimno visok morbiditet, mortalitet, trošak zdravstvene skrbi te dugotrajna, a ponekad i doživotna invalidnost. Jedina postojeća terapija moždanog udara u primjeni je tromboliza. Ona ima vrlo uzak terapijski prozor (unutar 5 sati) te može uzrokovati hemoragijske komplikacije. Zbog svega navedenoga, razvoj novih terapijskih strategija je jedan od prioriteta moderne medicine.

Od ukupnog broja moždanih udara 80% čine ishemijski.[39] Obzirom na to, razvijeni su eksperimentalni životinjski modeli fokalne cerebralne ishemije kako bi se što bolje oponašale promjene tijekom te nakon ishemijskog udara kod ljudi. Ti modeli se koriste kako bi se otkrili mehanizmi uključeni u razvoj ishemijske ozljede te time otvorile mogućnosti novih terapijskih strategija.

Većina moždanih udara nastaje kao posljedica okluzije srednje cerebralne arterije, stoga je većina životinjskih modela temeljena na tom principu.[40] Prema duljini trajanja okluzije ishemija može biti prolazna ili trajna. Prolazna ishemija uzrokuje različite stupnjeve ozljede ovisno o trajanju pa tako već 8 minuta ishemije može dovesti do nekroze neurona, a više od 30 min se obavezno povezuje s infarktom zahvaćenog područja.[41] Kod prolazne ishemije ozljeda nastaje i zbog same ishemije i zbog učinaka reperfuzije.

#### Model intraluminalne okluzije srednje cerebralne arterije

Ovaj model je izvorno opisao Koizumi i suradnici.[42] To je najčešće korišteni model moždanog udara zbog svoje jednostavnosti te neinvazivnosti. Srednja cerebralna arterija (MCA, *eng.* middle cerebral artery) se okludira uvođenjem monofilamenta u unutarnju karotidnu arteriju kako bi se blokirao protok kroz MCA prolazno ili trajno, ovisno o tome koliko dugo se filament ostavi na mjestu okluzije. Ovakav tip lezije tipično zahvaća lateralni kaudatus i putamen te frontoparijetalni korteks.[43]

Nastali infarkt je reproducibilan te veliki dio rano nakon okluzije čini ishemijska penumbra. Nekoliko tehničkih faktora može utjecati na veličinu infarkta: (1) fizičke razlike u korištenom monofilamentu, (2) udaljenost insercije filameta i (3) slučajna prerana reperfuzija. Stoga je vrlo važno da su korištene kirurške i tehničke procedure standardizirane kako bi se postigao što veći stupanj reproducibilnosti. Osim toga uobičajene komplikacije ovog modela su subarahnoidalno krvarenje, spontana hipertermija i mehaničko oštećenje endotela.

## 1.4. Reaktivne postishemijske promjene u tkivu

Ishemijska ozljeda tkiva uzrokuje oštećenje neurona i mreža koje oblikuju svojim povezivanjem, kao i oštećenje vaskularizacije zahvaćenog područja. Upala koja nastaje kao posljedica ozljede tkiva uzrokuje daljnje pogoršanje primarnog oštećenja te dovodi do progresivne kavitacije.

Zrela lezija se može podijeliti na dvije glavne cjeline: penumbru koju čine hipertrofični astrociti te jezgru ozljede sastavljenu od NG2 glije/oligodendrocitnih prekursora, fibroblasta porijeklom iz meninge ili krvnih žila, pericita, makrofaga/mikroglije. Svaka od navedenih cjelina zajedno sa pripadajućim stanicama prolazi kroz dinamične promjene te sudjeluje u oporavku tkiva od lezije.

### 1.4.1. Reaktivna glijoza

Reaktivna glijoza je odgovor živčanog tkiva na ozljedu, a uključuje hipertrofiju tijela i nastavaka astrocita.[44] Hipertrofija astrocita praćena je pojačanom ekspresijom glijalnog fibrilarnog proteina (GFAP, *eng.* glial fibrilar acidic protein) i ponovnom pojavom ekspresije nestina i vimentina.[45] Osim povećanja volumena dolazi i do porasta broja astrocita obzirom da dio astrocita (njih oko 20%), i to uglavnom onih smještenih jukstavaskularno ponovno ulazi u proliferaciju stvarajući nove astrocite.

Nedavna istraživanja potvrdila su važnost reaktivne glioze kod oporavka moždanog tkiva budući da smanjenje ili prevencija stvaranja glioznog ožiljka *in vivo* dovodi do povećanja veličine lezije, širenja upale, gubitka neurona te u konačnici lošijeg funkcionalnog oporavka.

### 1.4.2. Angiogeneza

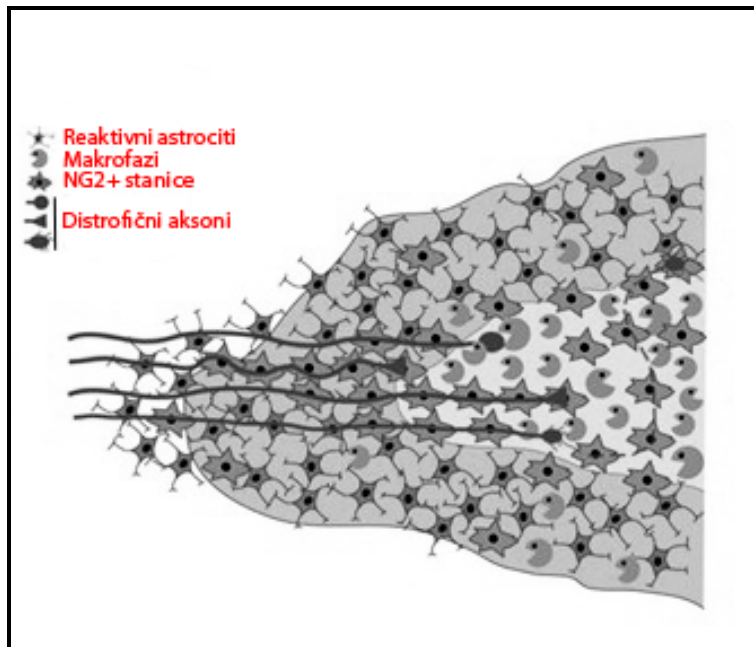
Angiogeneza je proces oblikovanja novih krvnih žila. Općenito, krvne žile se mogu stvarati vaskulogenezom ili angiogenezom. Vaskulogeneza označava de novo formaciju krvnih žila iz

proliferirajućih i diferencirajućih progenitornih stanica deriviranih iz mezoderma tijekom embrionalnog razvoja. S druge strane angiogeneza predstavlja formaciju novih žila iz već postojećih.

Ishemijska ozljeda inducira angiogenezu u oštećenom tkivu. Proliferacija endotelnih progenitora kao dio procesa vaskularnog remodeliranja je dokazano prisutna u postishemijskom striatumu.[46] Odmah nakon ishemije najprije dolazi do naglog pada u gustoći krvnih žila u samoj jezgri ozljede zbog nekroze i apoptoze endotelnih stanica. Ipak, već nakon 2 tjedna aktivan proces stvaranja novih krvnih žila dovodi do normalizacije gustoće krvnih žila u jezgri ozljede, a u određenim periinfaktnim regijama čak i do porasta gustoće na razinu veću u odnosu na pre-ishemijsku.

### **1.4.3. Reakcija aksona na ozljedu**

Osim nekroze stanica lezija tkiva uzrokuje i oštećenje te povlačenje aksona iz centra ozljede. Distrofična oštećena vlakna se zaustavljaju na određenoj udaljenosti od same jezgre ozljede zahvaljujući NG2+ stanicama koje imaju sposobnost zadržavanja distrofičnih aksona, a osim toga potiču i njihov ponovni rast suprotstavljajući se negativnom učinku makrofaga. Ovakav rast aksona u samu ozljedu vidljiv je naročito na rubu ozljede gdje je ujedno i najveća gustoća NG2+stanica.[47]



Slika 3. Rast distrofičnih aksona u ozlijeđeno područje pomoću NG2+ stanica koje stabiliziraju njihove nastavke i omogućavaju ponovni rast (preuzeto i prilagođeno iz 44).

## 1.5. Kliničke studije primjene matičnih stanica u liječenju moždanog udara

### 1.5.1. Objavljene kliničke studije

Prvo kliničko istraživanje stanične terapije moždanog udara objavljeno 2000. godine proveli su Kondziolka i suradnici koji su u 12 pacijenata transplantirali stanice derivirane iz humane linije teratokarcinoma.[48] Od tada pa do danas je publicirano još 17 kliničkih istraživanja koja su uključivala 430 pacijenata. Od toga su u devet studija stanice transplantirane intravenskim putem, u pet intrarterijskim putem, u tri studije se išlo direktno intracerebralno, a u jednoj intrarterijski i intravenski. Najčešće transplantirane vrste stanica su autologne mononuklearne stanice koštane

srži (MNC, *eng.* mononuclear cell) koje su korištene u čak devet istraživanja. Od ostalih stanica šest provedenih istraživanja transplantiralo je autologne mezenhimalne stanice koštane srži (MSC), jedno alogene umbilikalne mezenhimalne matične stanice (UCMSC, *eng.* umbilical cord mesenchymal stem cell.), dvije studije su koristile imortalizirane linije neurona podrijetlom iz teratokarcinomske linije te jedna studija stanice lateralne ganglionske eminencije podrijetlom iz svinje (Tablica 1.).

Navedena istraživanja pokazala su da je primjena matičnih stanica u terapijske svrhe sigurna, no razmjer terapijskog učinka je još uvijek predmet intenzivnog istraživanja.

### **1.5.2. Registrirane kliničke studije**

Pretraga NIH registra kliničkih istraživanja ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)) pokazala je da je trenutno u tijeku 20 registriranih studija koje planiraju uključiti 1068 pacijenata. Intravenski put transplantacije stanica izabralo je 11 studija, intraarterijski put dvije studije, intracerebralni tri, a intratekalni dvije. Najveći broj istraživanja provodi se u SAD-u, njih sedam, a po dvije studije su trenutno u tijeku u Kini, Španjolskoj, Indiji i Velikoj Britaniji (Tablica 2.).

Tablica 1. Objavljene kliničke studije

Vrsta stanica	Put primjene	Krakteristike pacijenata	Broj pacijenata	Glavni ishodi	Referenca
Imortalizirana linija neurona	IC	Ishemijski moždani udar, dob:44-75g	12	Poboljšanje funkcije	Kondziolka et al (2000)
Imortalizirana linija neurona	IC	Moždani udar, dob:18-75g	18	Poboljšanje prisutno kod nekih pacijenata Pojava epileptičnih napadaja, sinkopa i subduralnih hematoma	Kondziolka et al (2005)
LGE stanice (svinja)	IC	Ishemijski moždani udar, dob:18-70g	5	Studija prekinuta nakon 2g	Savitz et al (2005)
MSC (autologne)	IV	Akutni moždani udar, dob:30-75g	30	Poboljšanje funkcije, sigurna primjena	Bang et al (2005)
MSC (autologne)	IV	Kronični moždani udar, dob:40-70g	5	Poboljšanje funkcije, sigurna primjena	Suarez-Montegudo et al (2009)
MSC (autologne)	IV	Akutna ishemijska lezija u MCA teritoriju, dob:30-75g	85	Poboljšanje funkcije, sigurna primjena	Lee et al (2010)
MSC (autologne)	IV	Kronični moždani udar	12	Skromno poboljšanje, sigurna primjena	Bhasin et al (2011)
MSC (autologne)	IV	Moždani udar unutar 6 mjeseci, dob:20-75g	12	Volumen lezije reducirane	Honmou et al (2011)
MNC (autologne)	IA	MCA ishemijski moždani udar unutar 90 dana od pojave simptoma	6	Bez pogoršanja u neurološkim testovima	Battistella et al (2011)
MNC (autologne)	IV	Akutni moždani udar, dob:18-80g	10	Poboljšanje u nekim testovima, ali dva pacijenta s ekspanzijom infarkta	Savitz et al (2011b)
MNC (autologne)	IA	Umjereni do teški akutni MCA infarkt, dob:18-80g	20	Sigurna primjena, kliničko poboljšanje	Friedrich et al (2012)
MNC (autologne)	IV	Ishemijski moždani udar unutar 7-30 dana, dob:18-80g	11	Dobar klinički ishod	Prasad et al (2012)
MNC i MSC (autologne)	IV	Kronični moždani udar, dob:18-63g	40	Sigurna primjena, poboljšanje mBI	Bhasin et al (2013)
UCMSC (alogene)	IA	Moždani udar unutar 3 mjeseca, dob<60g	4	Poboljšanje mišićne snage	Jiang et al (2012b)
MNC (autologne)	IA	Težak moždani udar u MCA teritoriju	20	Pojava parcijalnih napadaja, bez poboljšanja funkcije	Moniche et al (2012)
MNC (autologne)	IA i IV	Subakutni MCA infarkt	12	Pojava epileptičnih napadaja kod 7 pacijenata	Rosado de Castro et al (2013)
MNC (autologne)	IA	Težak moždani udar u MCA teritoriju	20	Poboljšanje funkcije kod nekih pacijenata	Moniche et al (2014)
MNC (autologne)	IV	Moždani udar u MCA teritoriju unutar 7-30 dana, dob:18-75g	120	Sigurna primjena, bez značajnog poboljšanja	Prasad et al (2014)

Tablica 2. Registrirane kliničke studije

Vrsta stanica	Put primjene	Karakteristike pacijenata	Broj pacijenata	Mjesto	NCT identifikator
MSC iz masnog tkiva (alogene)	IV	Akutni cerebralni infarkt<12 sati	20	Španjolska	NCT01678534
MSC iz koštane srži (alogene)	IV	Ishemijski moždani udar>6 mjeseci	35	SAD	NCT01297413
Modificirane stromalne stanice (alogene)	NM	Ishemijski moždani udar	18	SAD	NCT01287936
MSC iz koštane srži (autologne)	IC	Ishemijski ili hemoragijski moždani udar	30	Kina	NCT01714167
MSC iz koštane srži (autologne)	IV	Ishemijski moždani udar unutar 7 dana	90	Kina	NCT01468064
MSC iz koštane srži (autologne)	IV	Moždani udar unutar 1 tjedan-2 mjeseca	50	Malezija	NCT01461720
MSC (autologne)	IV	Ishemijski moždani udar<14 dana	30	Francuska	NCT00875654
CTX0E03 živčane matične stanice	IC	Ishemijski moždani udar	12	Velika Britanija	NCT01151124
ALD-401 derivirane iz koštane srži (autologne)	IA	Akutni MCA moždani udar unutar 24 sata	100	SAD	NCT01273337
MNC iz koštane srži (autologne)	Intratekalno	Moždani udar	200	Indija	NCT02245698
MSC iz koštane srži (autologne)	IV	Ishemijski MCA udar	60	Južna Koreja	NCT01716481
MSC iz koštane srži (alogene)	IV	Ishemijski moždani udar unutar 24-72 sata	40	SAD	NCT01849887
CTX0E03	IC	Ishemijski moždani udar, pareza ruke tijekom minimalno 28 dana	41	Velika Britanija	NCT02117635
MNC iz koštane srži (autologne)	IA	Akutni ishemijski moždani udar	76	Španjolska	NCT02290483
MNC iz koštane srži (autologne)	Intratekalno	Ishemijski ili hemoragijski moždani idar	50	Indija	NCT01832428
MSC iz koštane srži (alogene)	IV	Akutni ishemijski moždani udar unutar 3-10 dana	48	SAD	NCT01922908
Umbilikalne MSC (alogene)	IV	Akutni moždani udar unutar 7 dana	18	Republika Koreja	NCT02378974
Stromalne stanice iz masnog tkiva (autologne)	IA i IV	Ishemijski ili hemoragijski moždani udar		Meksiko	NCT01453829
Umbilikalna krv (alogena)	IV	Ishemijski MCA moždani udar unutar 9 dana	10	SAD	NCT02397018
Multistem	IV	Kortikalni ishemijski infarkt	140	SAD	NCT01436487



## **2. Hipoteza i cilj rada**

### **2.1. Hipoteza**

Upala živčanog tkiva nakon ishemijske ozljede utječe na transplantirane živčane matične stanice tako da ubrzava njihovu diferencijaciju, povećava izražaj sinaptičkih biljega i smanjuje njihovo preživljenje.

### **2.2. Cilj rada**

#### **2.2.1. Opći cilj**

Analizirati preživljenje, diferencijaciju te izražaj sinaptičkih biljega živčanih matičnih stanica transplantiranih u moždano tkivo zahvaćeno ishemijom i njegovu zdravu kontrolu te tako utvrditi način na koji postishemijsko upalno zbivanje utječe na transplantirane živčane matične stanice.

#### **2.2.2. Specifični ciljevi**

- 1.Odrediti in vitro diferencijacijski i sinaptički potencijal živčanih matičnih stanica miša izoliranih iz embrionalnog korteksa
- 2.Odrediti stupanj preživljenja embrionalnih živčanih matičnih stanica miša obilježenih staničnim označivačima nakon transplantacije u motorički korteks miša s izazvanim ishemijskim moždanim udarom i u njegovu zdravu kontrolu
- 3.Usporediti diferencijacijski slijed matičnih stanica transplantiranih u mozak zahvaćen ishemijom i u njegovu zdravu kontrolu

4. Usporediti sinaptogeni potencijal matičnih stanica transplantiranih u mozak zahvaćen ishemijom i u njegovu zdravu kontrolu

### **3. Uzorci i postupci**

#### **3.1. Pokusne životinje**

U ovom istraživanju upotrijebljeni su mišji zamci i odrasli miševi dva visokosrođena mišja soja: B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J (YFP-16) i C57Bl/6NCrl. Za potrebe istraživanja upotrijebljene su gravidne ženke i njihovi zamci soja YFP-16, dok su odrasli mužjaci iz soja C57Bl/6. U istraživanju je upotrijebljeno 60 miševa: 7 gravidnih ženki za izolaciju živčanih matičnih stanica, 20 mužjaka za izazivanje moždanog udara i transplantaciju stanica (4 skupine po 5 životinja), 20 mužjaka kojima su transplantirane stanice (zdrave kontrole), 5 mužjaka za analizu postishemijskih reaktivnih promjena zajedno s još 5 kontrolnih zdravih mužjaka, te 3 mužjaka za potrebe analize proteina u moždanom tkivu. Svi postupci sa životinjama provedeni su skladu s Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13) te imaju dozvolu etičkog povjerenstva Medicinskog (Ur. broj: 04-77/2010-238) i Veterinarskog fakulteta (klasa: 640-01/12-17/33; Ur. broj: 251/61-01/139-13-4).

#### **3.2. Postupci sa životinjama**

##### **3.2.1. Uzgoj i smještaj životinja**

Životinje su smještene u nastambi Hrvatskog instituta za istraživanje mozga, Medicinski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu. Uvjeti smještaja i držanja laboratorijskih i pokusnih životinja propisani su Pravilnikom o zaštiti životinja (NN 47/2001) i Zakonom o zaštiti životinja (NN 135/2006); svjetlosni ciklus je 12 sati svijetlo i 12 sati mrak, hrana i svježa voda su *ad libitum*, temperatura u objektu je  $22 \pm 2$  °C, relativna vlaga  $55\% \pm 10\%$ , dok je osvjetljenje 300 luksa.

### 3.2.2. Razmnožavanje životinja

Kako bi dobili zametke odgovarajućeg stadija u kavez s jednim mužjakom stavljene su dvije ženke. Svako jutro ženka je pregledavana rodnica kako bi se utvrdila prisutnost sjemene tekućine u obliku vaginalnog čepa (*engl.* vaginal plug). Nalaz vaginalnog čepa odgovara početku graviditeta. Budući da se miševi pare tijekom noći, dan kada je nađen vaginalni čep se označava kao 0,5 dan starosti zametaka. Nakon uočavanja vaginalnog čepa, ženke su premještene u nove kaveze i držane su do ulaska u pokus, a mužjaku je u kavez pridružena nova ženka.

### 3.2.3. Žrtvovanje životinja

Životinje su žrtvovane na dva načina, ovisno o vrsti pokusa za koji su bile namijenjene. Gravidne ženke predviđene za izolaciju živčanih matičnih stanica kao i mužjaci predviđeni za izolaciju proteina iz moždanog tkiva žrtvovani su cervikalnom dislokacijom. Cervikalna dislokacija jest postupak koji u životinja izaziva trenutnu smrt i minimalnu bol. Životinja se fiksira u kaudalnom području glave te uz istovremeno povlačenje repa dolazi do prekida kralježnične moždine u području vrata i trenutne smrti. Nakon žrtvovanja gravidne ženke su položene na leđa i očišćene 70% alkoholom. Nakon otvaranja trbušne šupljine izolirani su rogovi maternice sa zametcima i premješteni u sterilnu petrijevku posudu napunjenu HBSS puferom (Hanks Balanced Salt Solution, Gibco by life Technologies, 14175095). Rogovi maternice čiji su zametci predviđeni za izolaciju živčanih matičnih stanica prenijeti su u sterilnim uvjetima u staničnu kulturu. Postupak izolacije živčanih matičnih stanica opisan je u poglavlju 3.3.1.

Mužjacima kojima su transplantirane stanice rađena je transkardijalna perfuzija. Neposredno prije žrtvovanja životinje su intraperitonealno anestezirane pojačanom dozom avertina (2,2,2-Tribromoethanol, T48402-5G, SIGMA). Nakon toga životinje su položene na leđa, očišćene 70% alkoholom te im je kirurškim škalicama otvorena trbušna i prsna šupljina. Opisanim načinom također nastaje brza i bezbolna smrt. Kirurškim škalicama prerezana je desna aurikula srca, a u lijevu klijetku srca polagano je injicirano do 30 mL PBS-a (*engl.* phosphate buffered

saline) kako bi se isprala sva krv iz životinje. Nakon pufera, na isto način injicirano je do 30 mL 4% PFA.

### **3.2.4. Određivanje dobi zametka**

Dob zametaka određena je praćenjem vaginalnih čepova, pri čemu se nalaz vaginalnog čepa označava kao 0,5 dan razvoja. Starost zametaka je dodatno potvrđena promatranjem vanjskih obilježja zametka, brojanjem somita te usporedbom s razvojnim stadijima opisanim u literaturi.[49]

### **3.2.5. Postupci sa životinjama**

#### **3.2.5.1. Izazivanje ishemijskog moždanog udara**

Ishemijski moždani udar u miša izazvan je pomoću privremenog jednostranog začepljenja srednje moždane arterije (*engl.* Middle Cerebral Artery Occlusion, MCAO) u trajanju od 60 minuta. Metoda je standardizirana i opisana u brojnim istraživanjima kao najprihvatljiviji model ishemijskog oštećenja mozga u miša.[50] Operacija je izvedena pod inhalacijskom anestezijom, mješavinom 2% izoflurana u 100% kisiku. Tjelesna temperatura životinje održavana je grijanom podlogom kako bi uklonili eventualni utjecaj varijacija temperature tijela na veličinu ozljede. Nakon uspavljivanja, životinja je položena i fiksirana na leđa. Neposredno prije operacije ventralna površina vrata očišćena je 70% alkoholom. Kirurškim škalicama načinjen je medijani rez na vratu, razmaknuto je vezivno tkivo i žlijezde slinovnice te je ispreparirana zajednička karotidna arterija (*a. carotis communis*) zajedno s njezinim granama. Tijekom prepariranja posebna pozornost je posvećena očuvanju živaca (*n. vagus* i *n. laryngeus recurrens*). Nakon prepariranja krvnih žila, na zajedničku karotidnu arteriju postavljen je prvi privremeni čvor. Drugi, trajni čvor, postavljen je na vanjskoj karotidnoj arteriji, što je kranijalnije moguće. Treći labavi čvor postavljen je također na vanjskoj karotidnoj arteriji, kaudalnije od drugog čvora, a kranijalno od račvanja zajedničke karotidne arterije. Nakon postavljanja čvorova, protok u

unutrašnjoj karotidnoj arteriji privremeno je zaustavljen postavljanjem samozatvarajuće pincete. Između drugog i trećeg čvora, malim kirurškim škalicama, učinjen je rez kroz koji je u vanjsku karotidnu arteriju uveden filament odgovarajuće veličine (Doccol). Filament je uveden iz vanjske karotidne arterije u zajedničku karotidnu arteriju. Tijekom uvođenja filameta, treći čvor je blago pritegnut kako bi se filament što više približio stijenci žile. Nakon toga vanjska karotidna arterija je u potpunosti prerezana kako bi se omogućilo što lakše uvođenje filameta u unutrašnju karotidnu arteriju. Blagim pritiskom, uklonjena je samozatvarajuća pinceta s unutrašnje karotidne arterije, a filament je polaganim izvlačenjem i okretanjem uveden u unutrašnju karotidnu arteriju. Laganim uvođenjem filameta u kranijalnom smjeru, filament je polagano ulazio na bazi lubanje u Willisov krug (circulus arteriosus cerebri). Filament se uvodio sve dok se, tijekom uvođenja, nije osjetio otpor. Filament uveden na takav način onemogućuje protok krvi kroz srednju moždanu arteriju (a. cerebri media) te dovodi do ishemije područja njezine opskrbe. Smatra se da je filament na dobrom mjestu ako je uveden 10 mm od račvanja zajedničke karotidne arterije. Nakon namještanja filameta treći čvor je stegnut kako ne bi došlo do njegovog izvlačenja. Rana je zatvorena metalnim kopčama, a miš je stavljen u grijani kavez tijekom 60 minuta. Tijekom ovog razdoblja praćeno je ponašanje životinja. Nakon 60 minuta životinja je ponovno uvedena u inhalacijsku anesteziju, fiksirana kao i tijekom operacije. Metalne kopče su skinute, a žlijezde slinovnice pažljivo razmaknute. Treći čvor je potom lagano otpušten, a filament polagano izvučen iz žile. Kada je filament izvučen dovoljno kaudalno, na unutrašnju karotidnu arteriju je ponovno stavljena samozatvarajuća pinceta kako bi se spriječilo krvarenje, a filament je potom u potpunosti izvađen iz krvnih žila. Nakon vađenja filameta, treći čvor je čvrsto stegnut, a samozatvarajuća pinceta otpuštena sa unutrašnje karotidne arterije. Prvi čvor na zajedničkoj karotidnoj arteriji također je otpušten te je protok krvi ponovno uspostavljen. Rana na vratu zašivena je kirurškim koncem, a životinjama je intraperitonealno aplicirano 0,5 mL fiziološke otopine i analgetik buprenorfin (0,03 mg/kg). Životinja je potom vraćena u grijani kavez tijekom 24 sata. Nakon operacije, hrana i voda su *ad libitum*. Operacija je izvođena pod disekcijskim mikroskopom (Zeiss, Stemi DV4 Spot) s hladnim izvorom svjetla. Instrumenti korišteni tijekom operacije jesu: retraktor, dvije pincete (Dumont 5-Dumoxel-B), dvije pincete (Dumont 7-Dumoxel-H), samozatvarajuća pinceta (FST by Dumont NO), kirurške škalice, male kirurške škalice (FST 15000-02), dva iglodržača, metalne kopče za zatvaranje rane

(FST 12032-07), konac (6-0, Silk, 4S). Instrumenti su sterilizirani prije operacije, kao i između pojedinih životinja.

### **3.2.5.2. Stereotaksijska transplantacija živčanih matičnih stanica**

Stereotaksijska transplantacija živčanih matičnih stanica je standardizirana metoda koja se koristi za transplantaciju stanica u mozak miša. Za potrebe ovog istraživanja, stanice su transplantirane dvadeset i četiri sata nakon moždanog udara pomoću uređaja Kopf (model 900LS) i Hamilton igle volumena 2  $\mu$ L (7002KH, ga25/70mm/pst2).

Stanice su pripremljene u staničnoj kulturi kako je opisano u poglavlju 3.3.4.

Prije početka operacije operacijsko polje i svi instrumenti su očišćeni i sterilizirani. Za anesteziju je intraperitonealno aplicirana 2,5% otopina avertina (2,2,2-Tribromoethanol, T48402-5G, SIGMA) u koncentraciji 0,5 g/kg tjelesne težine. Nekoliko minuta nakon aplikacije anestetika životinjama je provjerena budnost, blagim stiskom prstiju stražnjih udova pincetom. Nakon toga miš je smješten u stereotaksijski uređaj, na način da su gornji sjekutići smješteni u za njih predviđeni držač te fiksirani pomoću držača na nosnom dijelu lubanje. Zatim su namješteni lijevi i desni lateralni držači u sljepoočnom području te je na taj način životinja u potpunosti fiksirana. Nakon fiksiranja životinje 70% alkoholom očišćeno je operacijsko polje te je pomoću kirurških škara na tjemenom području glave napravljen rez na koži dužine 1,5 cm. Razmicanjem kože i potkožnog tkiva identificirana je bregma te su u odnosu na nju određene koordinate. Koordinate, mjesto transplantacije i volumen suspenzije stanica prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Stereotaksijske koordinate, mjesto transplantacije i volumen suspenzije stanica.

Anterio-posteriorna (AP)	Medio-lateralna (ML)	Dorzo-ventralna (DV)	Mjesto transplantacije	Volumen suspenzije stanica
-1,3	+2,0	-1,5	corpus callosum	1 $\mu$ L
-1,3	+2,0	-2,0	intracerebroventrikularno	1 $\mu$ L
+0,5	+2,5	-2,5	striatum	1 $\mu$ L

Nakon određivanja mjesta transplantacije, bušilicom je probušen svod lubanje. Hamilton igla smještena je u stereotaksijski uređaj te je u nju navučena suspenzija stanica. Igla je potom namještena iznad probušene lubanje te je lagano spuštена kroz ovojnice mozga do mjesta transplantacije. Suspenzija stanica je polako injicirana kroz 5 minuta. Po završetku injiciranja igla je ostavljena 2–3 minute u mozgu kako bi se osiguralo zadržavanje suspenzije na mjestu transplantacije, a zatim je polagano izvučena iz mozga. Životinja je potom izvađena iz stereotaksijskog uređaja, koža je sašivena kirurškim koncem, a životinja je stavljena u grijani kavez do potpunog razbuđivanja iz anestezije. Po završetku operacije, svi instrumenti su očišćeni alkoholom i sterilizirani, a Hamilton igla očišćena je 25% otopinom za čišćenje igle (Hamilton cleaning solution concentrate, 18311) te isprana sterilnom vodom.

### 3.2.5.3. Injekcije bromodeoksiuridina (BrdU)

Otopina bromodeoksiuridina (BrdU, *eng.* bromodeoxyuridine) (5-Bromo-2'-deoxyuridine, Sigma, B5002) pripremljena je u sterilnom PBS-u, u koncentraciji od 2mg/ml. Počevši od 24h nakon moždanog udara sve životinje su intraperitonealno injicirane s 50  $\mu$ g/g BrdU otopine. Životinje se injicirane svakih 12h tijekom slijedećih 10 dana. 24h nakon zadnje injekcije životinje su žrtvovane, a moždani rezovi su pripremljeni za imunohistokemijsko bojanje. Prije samog postupka tkiva su inkubirana u 10mM natrijevom citratu, pH 6,0 na 97°C/15 min.



### **3.3. Postupci sa stanicama**

#### **3.3.1. Izolacija živčanih matičnih stanica**

Za izolaciju živčanih matičnih stanica upotrijebljene su ženke gravidne 14,5 dana. Nakon žrtvovanja i izolacije gravidnih rogova maternice postupak izolacije živčanih matičnih stanica nastavljen je u sterilnim uvjetima, u laminaru u staničnoj kulturi. Rogovi maternice prebačeni su u sterilnu petrijevu posudu s HBSS puferom. Nakon odvajanja zametka od ovojnice, napravljena je dekapitacija te je pažljivo odvojen telencefalon. Izdvojeni telencefaloni su mehanički usitnjeni škalicama te su nakon toga premješteni u sterilnu tubu (BD Falcon, 50 mL). Na usitnjeno tkivo dodano je 5 mL akutaze (StemPro®Accutase® Cell Dissociation Reagent, Gibco by life Technologies, A11105-01) kako bi se tkivo proteolitički razgradilo i dobila suspenzija stanica.

Usitnjeno tkivo inkubirano je akutazom 20 minuta, na temperaturi od 37 °C. Tijekom tih 20 minuta, tkivo je dodatno usitnjeno mehaničkim provlačenjem kroz nastavak za pipetu. Nakon 20 minuta stanična suspenzija je prebačena u novu tubu i na nju je dodano isto toliko medija kako bi se inaktivirala akutaza. Dobivena otopina je potom centrifugirana 6 minuta pri brzini od 300 g i temperaturi 21 °C. Nakon centrifugiranja tekući dio je uklonjen, a na talog je dodano 2 mL medija kako bi se dobila suspenzija pojedinačnih stanica. U međuvremenu je pripremljen novi medij za uzgoj stanica. U flasku od 75cm<sup>2</sup> (BD Falcon, 353110) stavljeno je 25 mL medija (DMEM/F-12 (1:1) (1X)+GlutaMAX<sup>TM</sup>-I, Gibco by life Technologies, 31331-028) te dodano 500 µL B-27 (B-27®Supplement (50X), Gibco by life Technologies, 17504-044), 250 µL N-2 (N-2 Supplement (100X), Gibco by life Technologies, 17502-048), 250 µL Pen Strep (Penicillin Streptomycin, Gibco by life Technologies, 15070-063), 50 µL bFGF (Recombinant Mouse Fibroblast Growth Factor-basic, PMG0035) i 50 µL EGF (Recombinant Mouse Epidermal Growth Factor, PMG8041). Stanice u flaskama uzgajane su u inkubatoru na 37°C i 5% CO<sub>2</sub>.

### **3.3.2. Uzgoj neurosfera**

Nakon izolacije, stanice u flaskama stavljene su u inkubator na 37°C i 5% CO<sub>2</sub>. Stanice su u ovim uvjetima uzgajane do pojave neurosfera. Opisanim načinom uzgoja, uz kontinuiran nadzor, nakon dva dana uzgoja iz pojedinačnih stanica staničnim diobama nastale su neurosfere odgovarajućeg promjera za daljnji postupak.

### **3.3.3. Priprema stanica za pokuse *in vitro***

#### **3.3.3.1. Disocijacija stanica**

Uzgojene neurosfere zajedno s medijem premještene su u sterilne tube od 50 mL te centrifugirane pri brzini od 300 g, 6 minuta na 21°C. Nakon centrifugiranja medij je uklonjen, a na stanice dodano 2 mL akutaze. Stanice su inkubirane u akutazi tijekom 10 minuta uz povremeno mehaničko razbijanje pipetom. Nakon 10 minuta, tekući sadržaj je premješten u novu tubu uz dodavanje 5 mL novog medija, kako bi se onemogućilo daljnje djelovanje enzima. Takva otopina je potom centrifugirana, a dobiveni stanični talog je resuspendiran u svježem mediju i premješten u čiste flaske s medijem, pri čemu je stavljeno pola starog medija, a pola je nadodano novog medija s proliferacijskim čimbenicima.

#### **3.3.3.2. Priprema podloga za diferencijaciju stanica**

Priprema podloga uključuje pripremu stakala (*engl.* cover slips) promjera 12 mm za diferencijaciju stanica. Navedena stakla su najprije preko noći ostavljena u dušičnoj kiselini, nakon toga ispirana dva sata sterilnom vodom te potom opet preko noći ostavljena u 70% alkoholu. Slijedeći dan stavljena su u sterilizator 12 sati na temperaturi od 250°C. Na očišćena stakla stavljeno je 130 µL Poly-D-lizina u koncentraciji 500 µg/mL (Poly-D-lysine hydrobromide, SIGMA, P6407-5MG) koji je stajao 24 sata. Nakon ispiranja Poly-D-lizina sterilnom vodom stakla su premještena u ploče za diferencijaciju (*engl.* 24 well plate) te je na

njih stavljeno 400  $\mu$ L laminina u koncentraciji 10  $\mu$ g/mL (Laminin from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma basement membrane, SIGMA, L2020-1MG) koji je također stajao 24 sata. Laminin je ispran dva puta sa svježim medijem. Na taj način pripremljena stakla bila su spremna za diferencijaciju stanica.

### **3.3.3.3. Diferencijacija stanica**

Nakon disocijacije, stanice su stavljene u flaske na 5–6 sati do formiranja malih sfera. Nakon toga stanice su centrifugirane i nasadene u koncentraciji 200–250 000 stanica po staklu. Stanice su na diferencijaciju stavljene u novom mediju, bez čimbenika rasta (bFGF i EGF). Na takav način stanice su uzgajane u vremenskim točkama 1, 3, 5 i 7 dana. Nakon 24 sata stanicama je promijenjen medij. Od ukupnog volumena 500  $\mu$ L medija pipetom je izvučeno 250  $\mu$ L, a dodano je 500  $\mu$ L novog medija Neurobasal (Neurobasal®Medium (1X), Gibco by life Technologies, 21103-049). Budući da u ovom mediju nema glutamina, on se dodatno dodaje (Pen Strep Glutamine (100X) Gibco by life Technologies, 10370-016).

### **3.3.3.4. Fiksacija diferenciranih stanica**

U određenim vremenskim točkama stanice su fiksirane s 1 mL 4% PFA kroz 15 minuta. Nakon fiksacije stanice su tri puta isprane PBS-om i ostavljene na +4°C do postupka imunocitokemije.

### **3.3.3.5. Imunocitokemija**

Fiksirane stanice ispirane su tri puta po pet minuta PBS-om te potom inkubirane tijekom sat vremena u 500  $\mu$ L otopine za permeabilizaciju i blokiranje nespecifičnog vezanja protutijela (0,2% triton X-100 (Sigma, T8787-100ML) u PBS-u + 3% kozjeg seruma). Nakon blokiranja stanicama je dodano 85  $\mu$ L otopine primarnog protutijela (0,2% triton X-100 u PBS-u + 1% kozjeg seruma + primarno protutijelo) te su stanice u navedenoj otopini inkubirane na +4°C

preko noći. Primarna protutijela, podrijetlo, razrjeđenje i proizvođač, upotrijebljena u ovom istraživanju prikazana su u Tablici 4.

Drugi dan su primarna protutijela isprana PBS-om tri puta po pet minuta. Nakon ispiranja primarnih protutijela na stanice je stavljena otopina sekundarnih protutijela (0,2% triton X-100 u PBS-u + sekundarno protutijelo) te su tako stanice inkubirane dva sata na sobnoj temperaturi u zamračenoj prostoriji. Sekundarna protutijela, podrijetlo, razrjeđenje i proizvođač, upotrijebljena u ovom istraživanju prikazana su u Tablici 5. Nakon dva sata, isprana su sekundarna protutijela, također tri puta po pet minuta te je na stanice stavljena fluorescentna boja za jezgre, DAPI u koncentraciji 1:8000. Nakon deset minuta, DAPI je ispran, također tri puta po pet minuta te su stanice poklopljene medijem za fluorescentno poklapanje (Dako Fluorescent Mounting Medium, S3023). Poklopljeni preparati, ostavljeni su na +4°C na sušenju do mikroskopiranja na konfokalnom mikroskopu (Zeiss, LSM 510 Meta).

#### **3.3.3.6. Western blot**

Moždano tkivo dobiveno je cervikalnom dislokacijom životinje te smrzavanjem izdvojenog tkiva u tekućem dušiku. Smrznuto tkivo je potom stavljeno u 2ml hladnog pufera za otapanje (150 mM sodium chloride, 1.0% NP 40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS (sodium dodecyl sulphate), 50 mM Tris, pH 8.0, uz dodane proteazne inhibitore) te usitnjeno pomoću staklenog Dounce homogenizatora na ledu tijekom pola sata. Homogenizirano tkivo je potom centrifugirano 10 minuta na 14000g pri temperaturi +4°C. Stanice kultivirane na pločama (eng. 6 well plate) su sakupljene u odgovarajućim vremenskim točkama pomoću pufera za otapanje. Stanični lizati su potom inkubirani na ledu tijekom 30 minuta uz povremeno vorteksiranje te nakon toga centrifugirani 10 minuta na 14000g pri temperaturi +4°C. Koncentracija proteina u uzorcima određivana je Bradford-ovom metodom. U epruvetama od 1,5 ml pripremljeno je po 100 µL serijskih razrjeđenja standardnih otopina bjelančevine BSA koncentracije 1mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL i 0,125 mg/mL te uzoraka staničnih lizata i tkivnih homogenata. Pojedinačni uzorci u volumenu od 10 µL su potom dodani u pojedinačne jažice ploče (eng. 96 well plate). U svaku jažicu je dodano 200 µL 5 puta razrijeđene otopine Bradford.

Pomoću spektrofotometrijskog uređaja izmjerena je apsorbancija svakog uzorka. Kao slijepa proba upotrijebljen je pufer u kojem su otopljene stanice i tkivo. Na temelju izmjerene apsorbancije i poznate koncentracije u standardnim otopinama učinjena je baždarna krivulja iz koje je očitana koncentracija ukupnih bjelančevina u pojedinim uzorcima.

Jednake količine proteina pojedinih uzoraka pomiješanih s puferom za nanošenje uzoraka smo potom nanijeli sa poliakrilamidni gel. Poliakrilamidni gel nastaje polimerizacijom akrilamida i bisakrilamida, a stupanj umreženosti i veličina pora gela ovise o njihovim koncentracijama i međusobnom omjeru.

Nakon nanošenja uzorci su podvrgnuti elektroforezi. Elektroforeza je provedena u okomito postavljenoj aparaturi, gdje se gel nalazi između dvije staklene pločice, a uzorci se pod utjecajem električnog polja kreću kroz gornji gel za sabijanje i donji gel za razdvajanje. Kao molekularni biljeg upotrijebljen je ColorBurst Electrophoresis marker (Sigma, C1992).

Po završetku elektroforeze poliakrilamidni gel je odvojen od staklenih ploča i složen u kutiju za prijenos bjelančevina na membranu, zajedno s PVDF membranom (Immobilon-P Polyvinylidene difluoride membranes, Sigma). Kako bi se membrana aktivirala inkubirana je u metanolu 1-2 minute. Prijenos bjelančevina s gela na membranu odvijao se u puferu za prijenos (Tris 3g, glicin 14g, 20% metanol) tijekom jednog sata pri stalnom naponu od 100V.

Membrana s vezanim bjelančevinama inkubirana je u otopini za blokiranje, 2% mlijeko u prahu u puferu za ispiranje (400  $\mu$ L, Tween 20 u puferu PBS) na tresilici, da se spriječi nespecifično vezanje protutijela na membranu. Nakon toga membrana je inkubirana s otopinom odgovarajućih primarnih protutijela preko noći na +4°C (primarna protutijela, podrijetlo, razrjeđenje i proizvođač, upotrijebljena u ovom istraživanju prikazana su u Tablici 6). Slijedilo je ispiranje 5 puta po 10 minuta u puferu za ispiranje, te 2 sata inkubiranja u otopini sekundarnih protutijela obilježenih peroksidazom (sekundarna protutijela, podrijetlo, razrjeđenje i proizvođač, upotrijebljena u ovom istraživanju prikazana su u Tablici 7). Membrana je nakon inkubacije s protutijelima isprana 5 puta po 10 minuta u puferu za ispiranje. Na ispranu membranu dodana je otopina supstrata za peroksidazu. Imunoreaktivne vrpce su potom vizualizirane izlaganjem membrana filmu (Carestream Kodak BioMax light film, SIGMA, Z373508) u tamnoj komori te

daljnjom inkubacijom filma u razvijaju (Carestream Kodak Processing chemicals, Sigma, P6557) i fikseru (Carestream Kodak Processing chemicals Sigma, P5670).

### **3.3.4. Priprema stanica za pokuse *in vivo***

#### **3.3.4.1. Obilježavanje stanica fluorescentnom bojom**

Stanice koje su pripremljene za *in vivo* pokuse, izolirane su, uzgajane i disocirane na identičan način kako je opisano u prethodnim poglavljima (3.3.1. i 3.3.2.). Fluorescentna boja upotrijebljena u ovom istraživanju jest PKH26 (PKH26GL-1KT, PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit for general cell membrane labeling, SIGMA, 081M0964). To je lipofilna boja koja boji stanične membrane. Neposredno prije bojanja, boja je pomiješana s otopinom na bazi etanola prateći upute proizvođača, na 1 mL otopine dodaje se 4  $\mu$ L boje. Stanice su držane u otopini za bojanje 5 minuta te povremeno lagano protresene. Nakon toga je na suspenziju stanica dodana jednaka količina govedjeg seruma kako bi se blokirao učinak boje te je sve zajedno inkubirano jednu minutu. Kako bismo se riješili boje, stanice su ispirane medijem i centrifugirane tri puta. Nakon zadnjeg centrifugiranja stanice su resuspendirane do koncentracije  $10^5$  po 1  $\mu$ L, te su na ledu prenijete do prostora za stereotaksijsku transplantaciju.

#### **3.3.4.2. Obilježavanje stanica BrdU-om**

Za *in vitro* obilježavanje BrdU-om svježe disocirane stanice su inkubirane u otopini 10  $\mu$ M otopini BrdU tijekom 8h nakon čega je medij uklonjen te zamijenjen svježim. Za potrebe transplantacije stanice su potom centrifugirane te resuspendirane do koncentracije  $10^5$  po 1  $\mu$ L. Tako pripremljene stanice su potom na ledu prenijete do prostora za stereotaksijsku transplantaciju.

### **3.4. Postupci s tkivima**

#### **3.4.1. Izolacija i fiksacija tkiva**

Životinjama kojima je rađena transkardijalna perfuzija izoliran je mozak. Životinje su dekapitirane pomoću škara, zatim je razrezana koža na glavi, a kosti glave medijano su prerezane škarama. Kada su razmaknute kosti glave, mozak je izvađen iz lubanje pomoću metalne špatule i ostavljen u 4% PFA na 24 sata. Drugi dan tkiva su isprana u PBS-u te su premještena u 10% otopinu saharoze na 24 sata, a potom u 30% otopinu saharoze. Tkiva u 30% otopini saharoze plutaju na površini, nakon tri dana potonu na dno tube i mogu se rezati pomoću kriorezača. Uloga saharoze jest izvući višak tekućine iz tkiva kako se tijekom smrzavanja ne bi stvorili kristali koji bi mogli oštetiti tkivo tijekom rezanja.

#### **3.4.2. Priprema histoloških preparata**

Nakon fiksacije i krioprotekcije pomoću saharoze tkiva su uronjena u tekućinu za smrzavanje (Tissue-Tek, OCT Compound Containing 125 mL, 1231400013) te su naglo smrznuta na -80°C. Uklopljeni blok tkiva zalijepljen je na nosač te ostavljen na -20°C kroz sat vremena kako bi se temperirao na temperaturu rezanja. Sva tkiva rezana su pomoću kriorezača (Leica, CM 1850) na rezove debljine 20 µm, a rezovi su postavljeni na pozitivno nabijena stakla (Menzel-Gläser, Superfrost, Thermo Scientific). Narezana tkiva su, do uporabe, pohranjena u frižideru na -20°C.

#### **3.4.3. Bojenje prema Nisslu**

Kako bismo vizualizirali područje mozga oštećeno moždanim udarom, nekoliko stakala s rezovima obojana su prema Nisslu (krezil-violet). Prije samog bojanja preparati su temperirani na sobnoj temperaturi i isprani u PBS-u. Preparati se najprije po dvije minute provedu kroz silazni niz alkohola (apsolutni alkohol, 96% alkohol i 70% alkohol), da bi se nakon toga preparati stavili u otopinu krezil-violeta kroz dvije minute. Nakon bojanja preparati su isprani u

destiliranoj vodi i provedeni kroz uzlazni niz alkohola (70% alkohol, 96% alkohol i apsolutni alkohol). Nakon uzlaznog niza alkohola preparati su prosvijetljeni u ksilenu. Preparati su potom poklopljeni pomoću medija za poklapanje (histomount, National diagnostics), pokriveni pokrovnim stakalcem i ostavljeni na sušenju na sobnoj temperaturi. Nakon sušenja preparati su skenirani običnim skenerom.

### **3.4.5. Imunohistokemija**

Stakla s rezovima tkiva su prije postupka imunohistokemije sat vremena držana u eksikatoru kako se prilikom postupka ne bi odljepljivali sa stakala. Rezovi su potom isprani s PBS-om četiri puta po petnaest minuta. Nakon ispiranja je na rezove stavljena otopina za permeabilizaciju i blokiranje nespecifičnog vezanja protutijela (0,2% triton X-100 u PBS-u + 3% kozjeg seruma) tijekom 60 minuta. Inkubacija primarnim protutijelima (0,2% triton X-100 u PBS-u + 2% kozjeg seruma + primarno protutijelo) se odvijala u frižideru na +4°C preko noći. Primarna protutijela, podrijetlo, razrjeđenje i proizvođač, upotrijebljena u ovom istraživanju prikazana su u Tablici 4. Primarna protutijela su isprana PBS-om tri puta po deset minuta. Nakon ispiranja primarnih protutijela na rezove je stavljena otopina sekundarnih protutijela (0,2% triton X-100 u PBS-u + sekundarno protutijelo) koja je inkubirana dva sata na sobnoj temperaturi. Budući da su upotrijebljena sekundarna protutijela fluorescentna, inkubacija se zbivala u zamračenoj prostoriji. Sekundarna protutijela, podrijetlo, razrjeđenje i proizvođač, upotrijebljena u ovom istraživanju prikazana su u Tablici 5. Postupak ispiranja sekundarnih protutijela i poklapanja identičan je kao što je opisano u poglavlju 3.3.3.5.



Tablica 4. Primarna protutijela upotrijebljena za imuhohistokemiju i imunocitokemiju.

Protutijelo	Podrijetlo	Razrjeđenje	Proizvođač
GFAP	pile	1:250	Abcam (ab4674)
Map2	pile	1:1000	Abcam (ab5392)
O4	miš	1:200	Sigma (O7139)
nestin	miš	1:200	Millipore (MAB353)
Synapsin 1	kunić	1:100	Cell Signaling (#2312)
PSD95	kunić	1:250	Cell Signaling (mAb #3409)
neuroigin 1	kunić	1:200	Millipore (AB15512)
neuroigin 1	miš	1:400	Synaptic Systems (129 111)
SynCAM 1	kunić	1:250	Millipore (ABT66)
Nop2	koza	1:200	Santa Cruz (sc-292098)
BrdU	miš	1:750	Cell Signaling (mAb #5292)
Ki67	kunić	1:300	Abcam (ab15580)
SMI32	miš	1:200	Eurogentec
laminin	kunić	1:100	Sigma (L9393)
GAP43	kunić	1:500	Novus Biologicals (NB300-143)

Tablica 5. Sekundarna protutijela upotrijebljena za imuhohistokemiju i imunocitokemiju.

Protutijelo	Razrjeđenje	Proizvođač
Alexa Fluor 546 koza anti - miš IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A11003)
Alexa Fluor 546 koza anti - pile IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A11040)
Alexa Fluor 546 koza anti - kunić IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A11010)
Alexa Fluor 488 koza anti - miš IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A11001)
Alexa Fluor 488 koza anti - kunić IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A11034)
Alexa Fluor 488 koza anti - pile IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A11039)

Tablica 6. Primarna protutijela upotrijebljena za Western blot

Protutijelo	Podrijetlo	Razrjeđenje	Proizvođač
Synapsin 1	kunić	1:1500	Cell Signaling (#2312)
PSD95	kunić	1:1500	Cell Signaling (mAb #3409)
neuroligin 1	kunić	1:1750	Millipore (AB15512)
SynCAM 1	kunić	1:1250	Millipore (ABT66)
Aktin	miš	1:15000	Millipore (MAB1501)

Tablica 7. Sekundarna protutijela upotrijebljena za Western blot

Protutijelo	Razrjeđenje	Proizvođač
Koza anti - miš IgG (H+L) (HRP)	1:15000	Abcam (ab6789)
Koza anti - kunić IgG (H+L) (HRP)	1:3000	Abcam (ab6721)

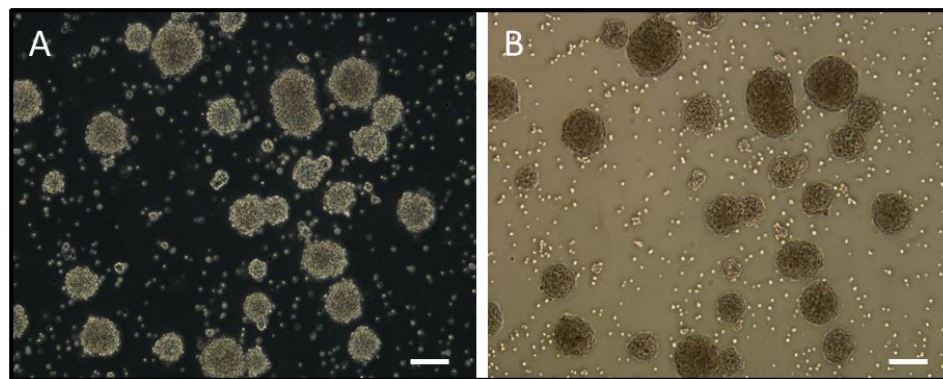
## 4. Rezultati

### 4.1. *In vitro* karakterizacija živčanih matičnih stanica

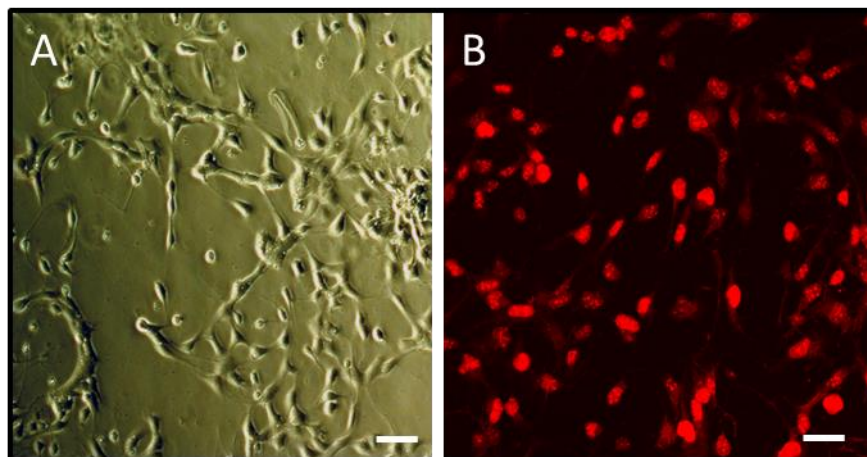
#### 4.1.1. Proliferacijski potencijal živčanih matičnih stanica

Živčane matične stanice uzgajali smo u kulturi uz prisutnost epidermalnog i fibroblastnog čimbenika rasta (EGF, *eng.* epidermal growth factor, FGF, *eng.* fibroblast growth factor). U navedenim uvjetima pokazali smo da broj stanica kontinuirano raste. To je bilo posebno vidljivo kod uzgoja u suspenziji, gdje umnožene ŽMS formiraju nakupine – neurosfere (slika 4).

Stanicama koje smo uzgajali tako da prijanjaju uz podlogu (adherentna kultura) je također rastao broj, no taj porast nije bio toliko brz kao u supenziji (slika 5). Na adherentnim kulturama smo napravili i imunocitokemijsku analizu proliferacijskog markera Ki67 te pokazali da je više od 99% stanica u kulturi pozitivno na Ki67. Navedeno ukazuje na visoki *in vitro* proliferacijski potencijal ŽMS i jak odgovor ŽMS na navedene čimbenike rasta (slika 5B).



Slika 4. (A) i (B) Prikaz suspenzijske kulture neurosfera nativno svjetlosnim mikroskopom (fazni kontrast). Crta mjerila-100 $\mu$ m.



Slika 5. Prikaz adherentne kulture ŽMS – (A) nativno svjetlosnim mikroskopom (fazni kontrast). (B) fluorescentnim imunocitokemijskim obilježavanjem (anti-Ki67). Crta mjerila-50 $\mu$ m.

#### 4.1.2. Diferencijacijski potencijal živčanih matičnih stanica

U svrhu određivanja diferencijacijskog potencijala ŽMS-a, neurosfere dobivene gore opisanim postupkom smo uzgajali u mediju bez proliferacijskih faktora. Stanice su bile nasadene na poli-D-lizinom i lamininom obložene podloge. Tako uzgajane neurosfere smo potom u vremenskim točkama: 0,1,3,5 i 7 dana analizirali protutijelima specifičnim za pojedine vrste stanica: ŽMS (anti-nestin), neurone (anti-Map2), gliju (anti-GFAP). Imunocitokemijom anti-O4 protutijelom nismo uspjeli pokazati prisutnost oligodendrocita u kulturi.

### Nulti dan diferencijacije (30 minuta nakon nasađivanja)

Na početku *in vitro* diferencijacije, oko 99% stanica čine nediferencirane nestin+ ŽMS. Ostalih vrsta stanica ima značajno manje, te je udio Map2 pozitivnih neurona i GFAP pozitivnih astrocita oko 1% (tablica 8). Nestin+ nediferencirane ŽMS polagano pružaju citoplazmatske izdanke te ih je u prosjeku oko 2-3 po stanici.

### Prvi dan diferencijacije

Nakon 24 sata uzgoja u diferencijacijskim uvjetima udio nediferenciranih stanica je značajno manji: postotak nestin+ ŽMS pada u odnosu na raniji stadij za otprilike 1/3 (s 99% na 70%). Istovremeno, udio diferenciranih stanica, i to prije svega Map2+ neurona naglo raste, s 1,5% na 30%, (slika 6A-C, tablica 8). Broj GFAP+ astrocita je pritom tek neznatno veći. Morfološki Map+ stanice u ovoj fazi uglavnom imaju obilježja nezrelih neurona s kratkim nastavcima te pojedinačnim razmještajem u kulturi.

### Treći dan diferencijacije

Treći dan uzgoja je obilježen dominacijom diferenciranih oblika stanica, i to uglavnom Map+ neurona. Udio Map+ neurona je veći u odnosu na raniji stadij za oko 50% (76% u odnosu na 30%), dok je udio nestin+ ŽMS istovremeno u jednakoj mjeri manji (24% u odnosu na 70%), (slika 6D-F, tablica 8). U konačnici je tako u kulturi broj diferenciranih Map+ neurona čak 3-4 puta veći u odnosu na broj nediferenciranih nestin+ ŽMS. Broj Gfap pozitivnih stanica je i dalje nizak (oko 1%). Navedene promjene u smislu smanjenja izražaja nestina i povećanja izražaja Map-a jasno ukazuju na postepenu diferencijaciju ŽMS u zrelije oblike stanica, i to pretežno u Map+ neurone, obzirom da je ekspresija GFAP-a u kulturi i dalje niska. Osim navedenog porasta u broju, prisutne su i određene promjene u morfologiji neurona. Tako neuroni sve više sliče zrelim neuronima s dužim nastavcima koje međusobno pružaju stvarajući temelj za buduće složene mreže nastavaka.

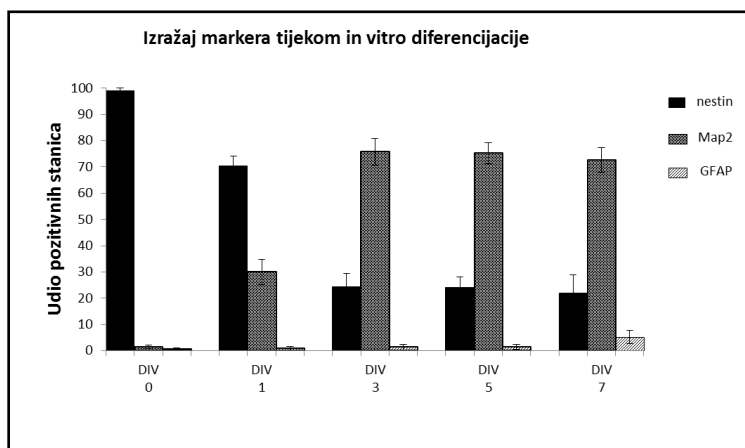
### Peti dan diferencijacije

Peti dan diferencijacije nema daljnjeg porasta broja Map+ neurona niti pada broja nestin+ ŽMS, pa je tako udio pojedinih vrsta stanica sličan kao ranije (oko 24% nestin+ ŽMS, 75% Map+

neurona, 1% GFAP+ astrocita) (slika 6G-I, tablica 8). Prisutne su, međutim, promjene u morfologiji stanica uzrokovane njihovim postepenim sazrijevanjem. Tako je mreža neurona sve gušća, a podloga ispod njih polagano se popunjava sve mnogobrojnijim citoplazmatskim izdancima preostalih nestin+ ŽMS koje se niti nakon 5 dana uzgoja nisu diferencirale.

### Sedmi dan diferencijacije

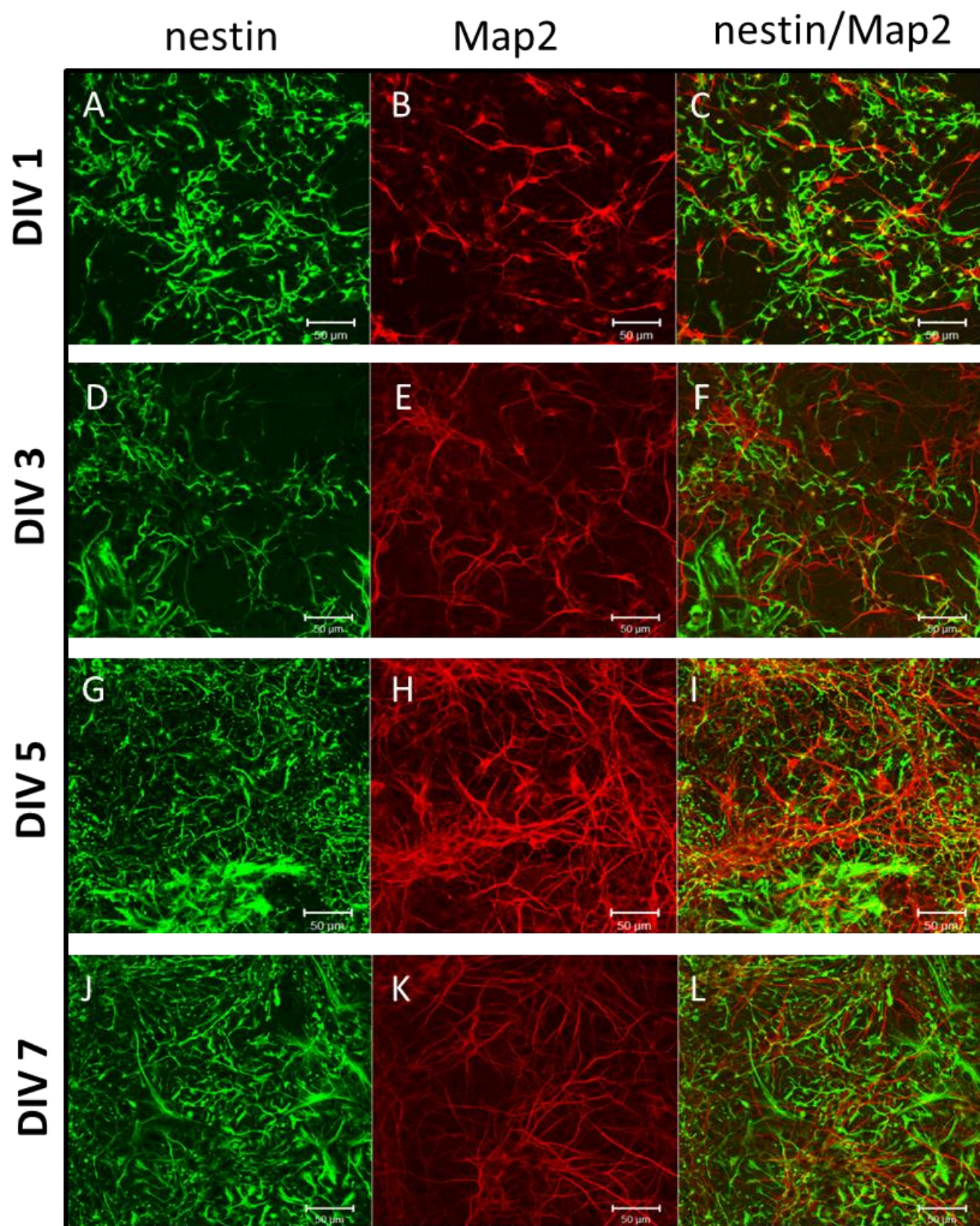
Sedmi dan diferencijacije je obilježen daljnjim rastom broja GFAP pozitivnih astrocita (s 1% na oko 5%) što se najvjerojatnije može pripisati proliferaciji postojećih astrocita koja obično nastupa u *in vitro* uvjetima između petog i sedmog dana. Pritom se udio Map+ neurona i nestin+ ŽMS i dalje bitno ne mijenja (slika 6J-L, tablica 8). Također je vidljivo daljnje sazrijevanje mreže neurona koja je sve gušća i deblja.



	DIV 0	DIV 1	DIV 3	DIV 5	DIV 7
nestin	99±1%	70,3±3,9%	24,3±5,1%	24,2±4%	22±6,8%
Map2	1,5±0,7%	30±4,9%	75,7±5,2%	75,2±4,1%	72,7±4,7%
GFAP	0,5±0,5%	1±0,7%	1,3±1%	1,5±1%	5,3±2,5%

Tablica 8. Prikaz udjela pojedinih stanica tijekom diferencijacije s grafičkim prikazom navedenih rezultata





Slika 6. Imunocitokemijski prikaz diferencijacije ŽMS u vremenskim točkama 0, 1 dan, 3 dana, 5 dana i 7 dana. Udio nestin+ ŽMS tijekom diferencijacije vrlo brzo pada dok se udio Map+ stanica višestruko povećava. Imunocitokemijska analiza kulture (A-C) prvog dana diferencijacije, (D-F) trećeg dana diferencijacije, (G-I) petog dana diferencijacije te (J-L) sedmog dana diferencijacije protutijelima anti-nestin i anti-Map2.

---

#### **4.1.3. Sinaptički potencijal živčanih matičnih stanica**

Uz gore navedenu analizu diferencijacijskog potencijala ŽMS, na istim kulturama, u istim vremenskim točkama je napravljena i analiza sinaptičkog potencijala pomoću protutijela usmjerenih na sinaptičke markere: SynCAM1, neuroligin 1, PSD95 i Synapsin 1. Dobiveni rezultati imunocitokemijskom analizom dodatno su potvrđeni Western blotom.

##### Izražaj proteina SynCAM 1

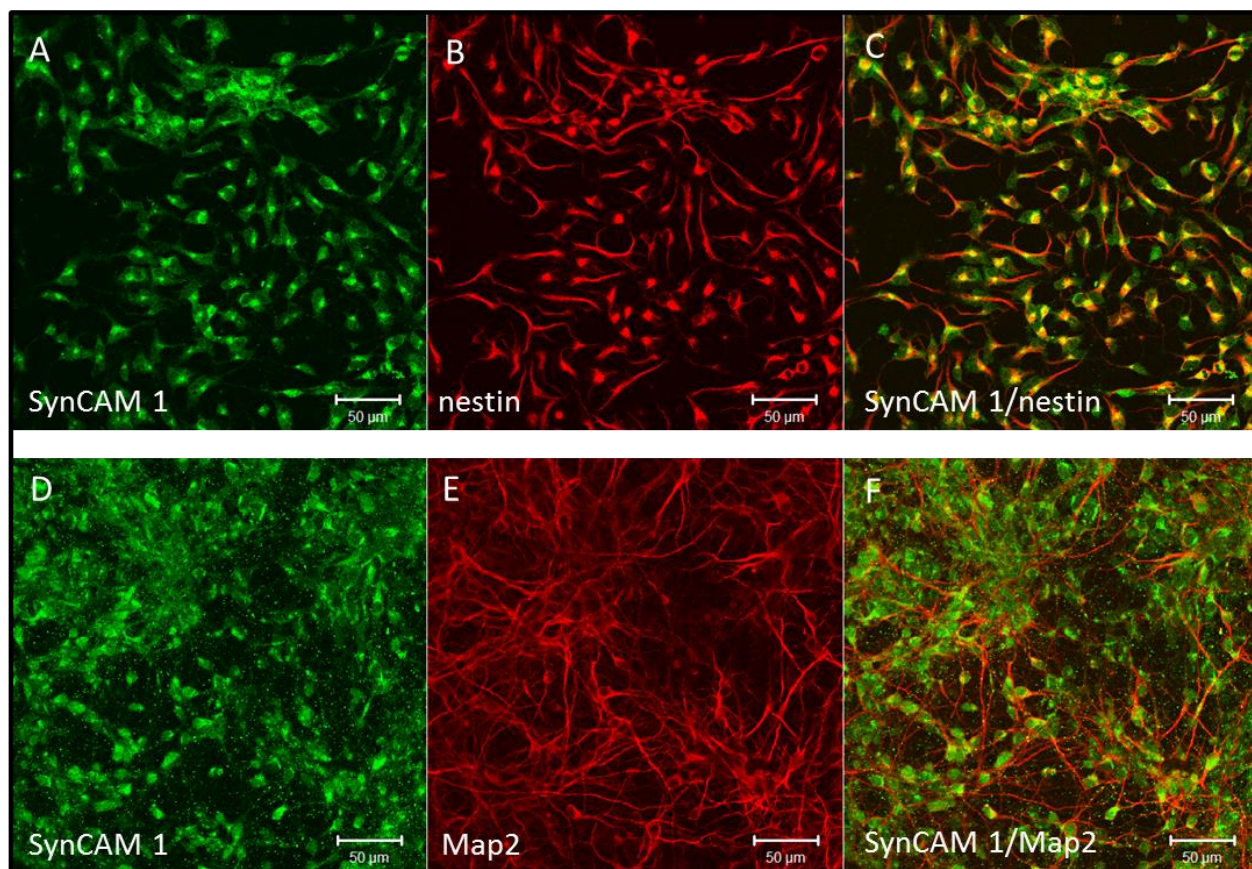
###### a) Imunocitokemijska analiza

SynCAM 1 signal prisutan je u citoplazmi nestin+ ŽMS od samog početka, neposredno nakon nasadivanja stanica na podloge. Signal je u ŽMS raspoređen pretežno u perinuklearnom dijelu citoplazme (slika 7A-C). Tijekom diferencijacije u kulturi izražaj SynCAM 1 polagano raste, budući da Map+ neuroni pokazuju jaču citoplazmatsku ekspresiju Syncam-a u odnosu na ŽMS. Od petog dana diferencijacije se uz navedeni perinuklearni signal u neuronima počinje javljati i točkasti signal raspoređen duž nastavaka koji najvjerojatnije odgovara sinaptičkim nakupinama SynCAM 1 proteina (slika 7D-F). Takav signal se nastavlja i tijekom sedmog dana diferencijacije, no s puno većom gustoćom. Uz jasnu ekspresiju SynCAM-a u neuronima signal se može prepoznati u nešto manjoj mjeri i kod GFAP+ astroglije.



b) Western blot

Navedene promjene u smislu postepenog porasta signala tijekom procesa *in vitro* diferencijacije vidljive su i na učinjenoj analizi Western blotom (slika 11G i H).



Slika 7. Imunocitokemijski prikaz porasta izražaja sinaptičkog markera SynCAM 1 tijekom *in vitro* diferencijacije ŽMS. SynCAM 1 je prisutan i u citoplazmi nediferenciranih ŽMS, a njegov signal postepeno tijekom diferencijacije raste. (A-C) Prikaz SynCAM 1 signala u nediferenciranim nestin<sup>+</sup> ŽMS nultog dana diferencijacije (30 minuta nakon nasađivanja). (D-F) Prikaz SynCAM 1 signala u Map2<sup>+</sup> neuronima petog dana diferencijacije.

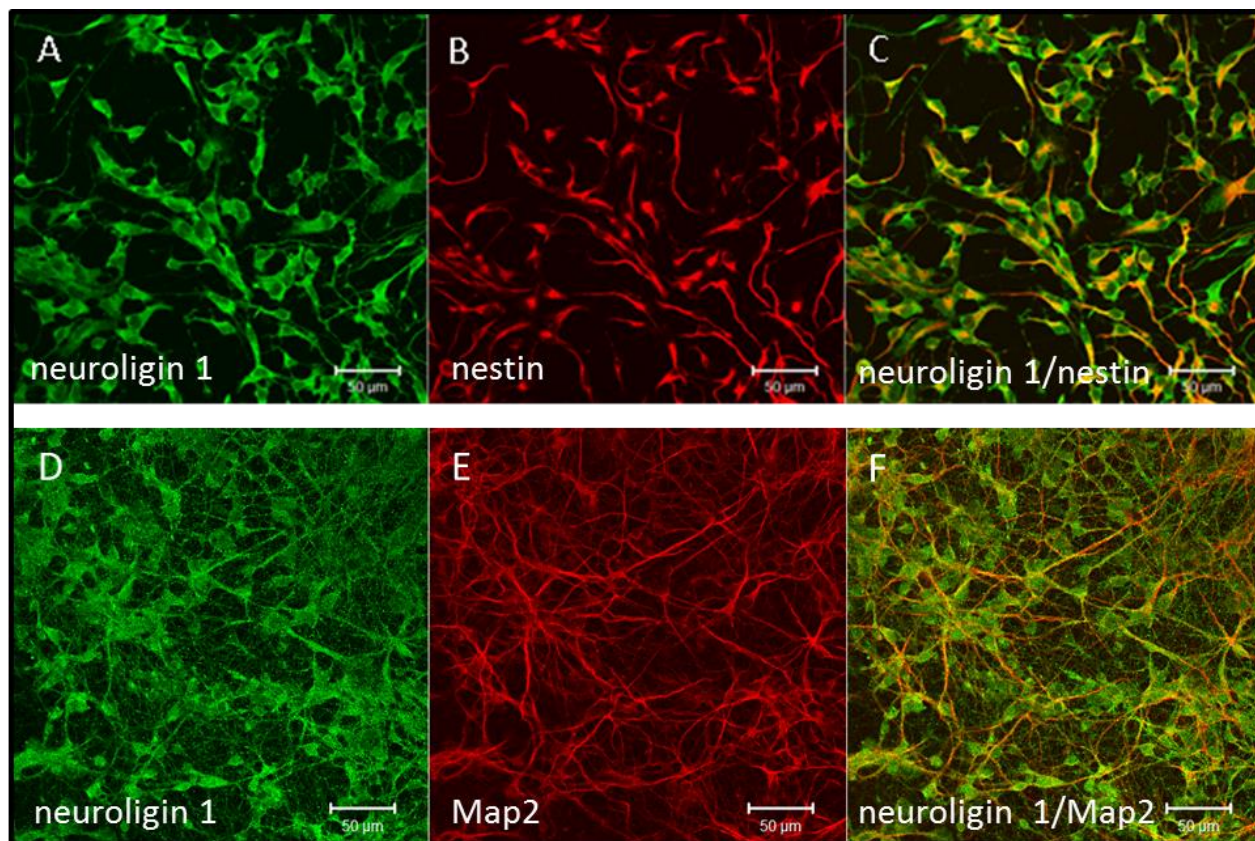
### Izražaj proteina neuroligin 1

#### a) Imunocitokemijska analiza

Neuroligin 1 signal je prisutan u nestin+ ŽMS, no signal je slabijeg intenziteta u odnosu na Map+ neurone (slika 8A-C). U skladu s time, napredovanjem diferencijacije raste i izražaj neuroligina u kulturi. Protein neuroligin 1 se nalazi u perinuklearnoj regiji i u nastavcima Map+ neurona. Jednako kao i kod SynCAM-a od petog dana u kulturi je vidljiv točkasti signal u nastavcima neurona koji se postepeno pojačava (slika 8D-F). Sedmog dana diferencijacije je signal najjači. GFAP+ astrociti ne pokazuju pozitivnost za neuroligin 1.

#### b) Western blot

Učinjena analiza pokazuje rast ekspresije neuroligina 1 od prvog dana diferencijacije pa do sedmog za oko 5 puta. Usporedba s homogenatom mišjeg mozga kao pozitivnom kontrolom, pokazuje da je razina proteina sedmog dana diferencijacije još uvijek oko 2 puta manja odnosu na razinu proteina u odraslom mozgu (slika 11C i D).



Slika 8. Imunocitokemijski prikaz porasta izražaja sinaptičkog markera neuroligina 1 tijekom *in vitro* diferencijacije ŽMS. Neuroligin 1 je prisutan i u citoplazmi nediferenciranih ŽMS, a njegov signal postepeno tijekom diferencijacije raste. (A-C) Prikaz neuroligin 1 signala u nediferenciranim nestin+ ŽMS nultog dana diferencijacije (30 minuta nakon nasađivanja). (D-F) Prikaz neuroligin 1 signala u Map2+ neuronima petog dana diferencijacije.



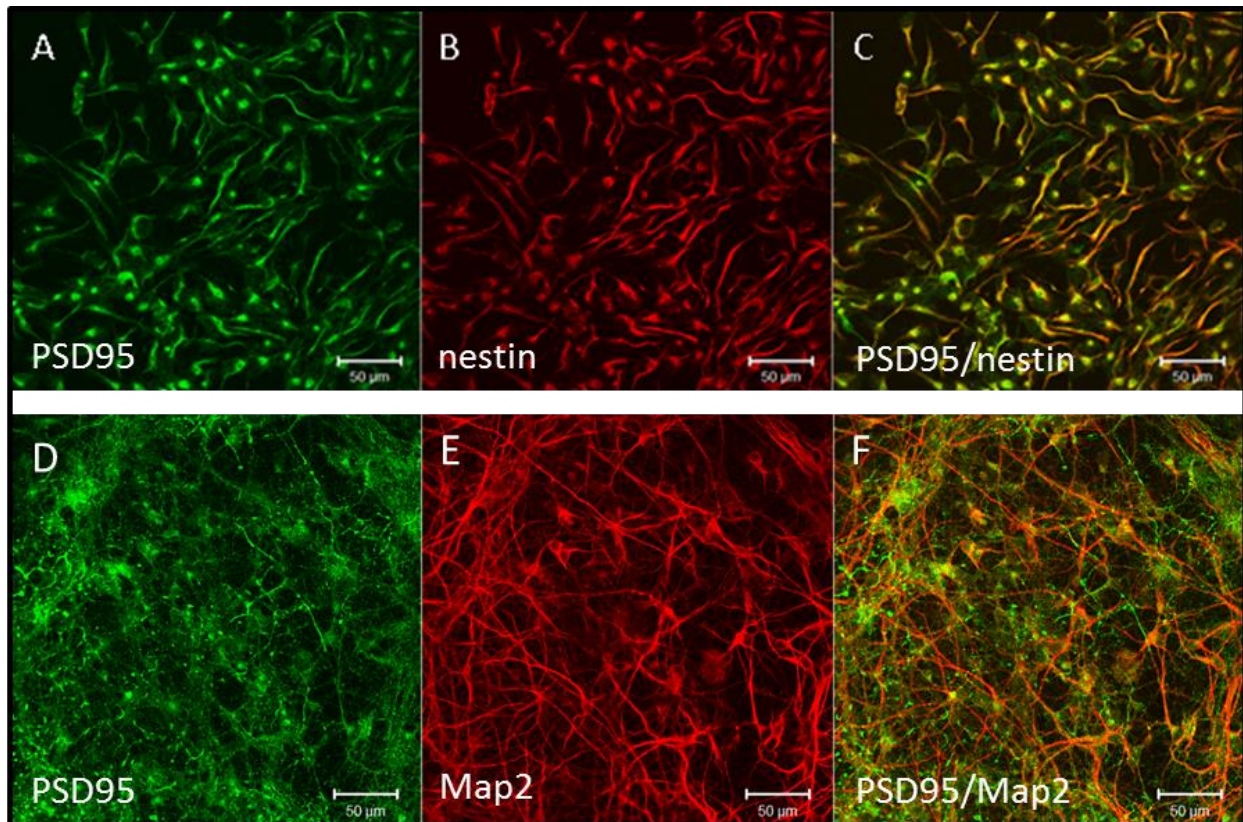
## Izražaj proteina PSD95

### a) Imunocitokemijska analiza

PSD95 pokazuje jak signal u nediferenciranim ŽMS (slika 9A-C). Diferencijacijom u kulturi novonastali Map+ neuroni nastavljaju proizvoditi PSD95 koji se smješta pretežno perinuklearno te u početnim dijelovima nastavaka (slika 9D-F). Pritom morfološki nezreli GFAP+ astrociti pokazuju PSD95 pozitivnost, no njihovim daljnjim sazrijevanjem taj se signal pomalo gubi.

### b) Western blot

Intenzitet PSD95 ekspresije u kulturi raste, te od prvog pa do sedmog dana poraste za oko 3 puta. Sedmi dan jačina izražaj je oko 2-3 puta manja u odnosu na razinu prisutnu u homogenatu odraslog mišjeg mozga (slika 11E i F).



Slika 9. Imunocitokemijski prikaz porasta izražaja sinaptičkog markera PSD95 tijekom *in vitro* diferencijacije ŽMS. PSD95 pokazuje jak signal u citoplazmi nediferenciranih ŽMS, a njegov signal raste tijekom diferencijacije. (A-C) PSD95 signal u nediferenciranim nestin+ ŽMS nultog dana diferencijacije (30 minuta nakon nasađivanja). (D-F) Prikaz PSD95 signala u Map2+ neuronima petog dana diferencijacije.

---

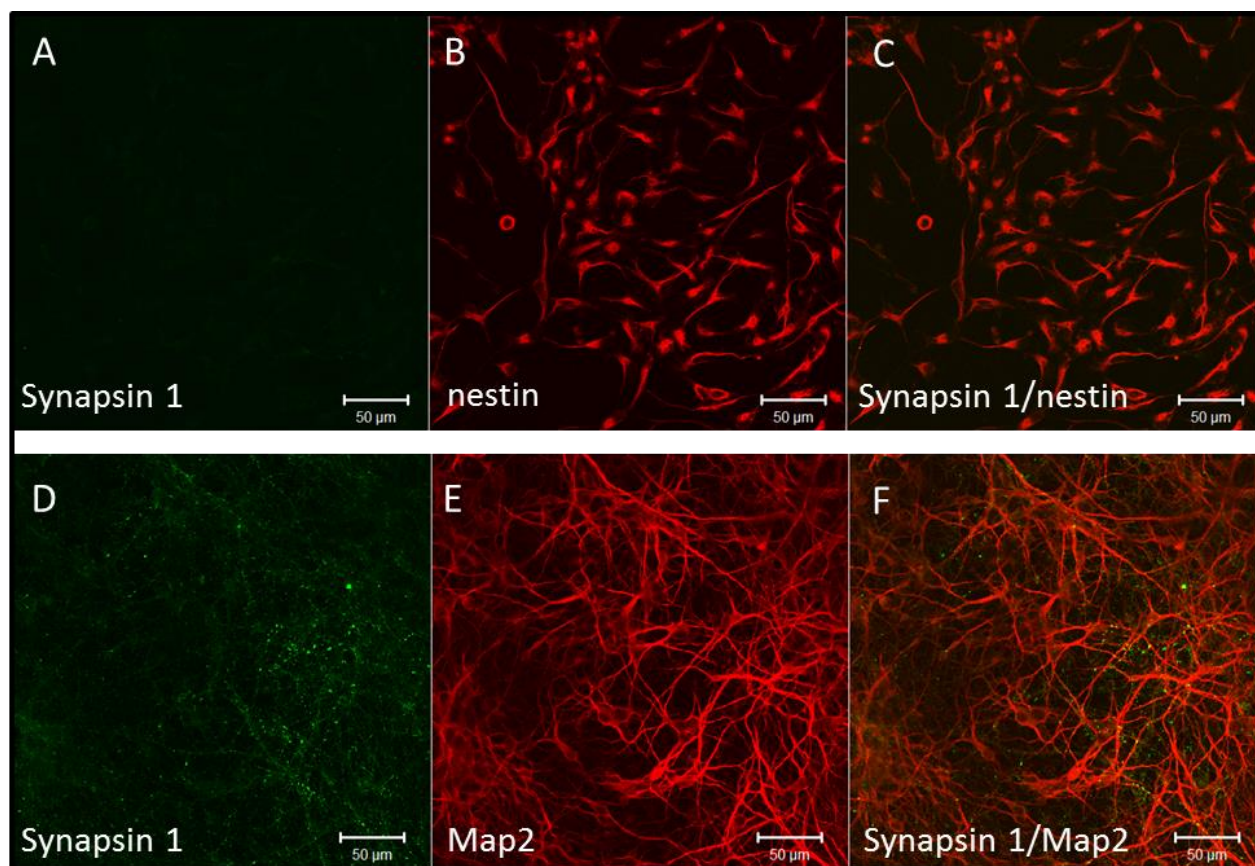
### Izražaj proteina Synapsin 1

#### a) Imunocitokemijska analiza

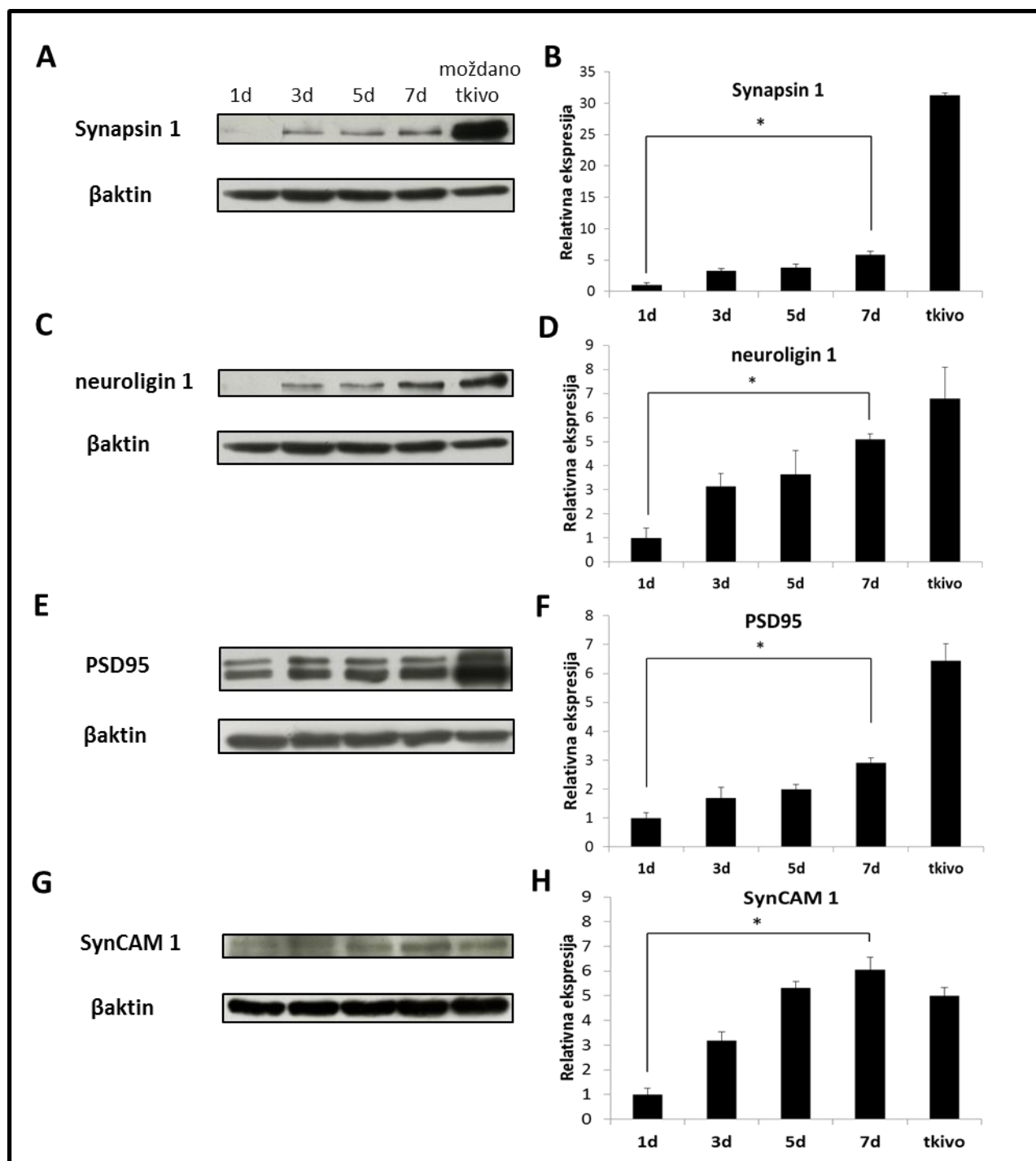
Za razliku od prethodno navedenih sinaptičkih proteina, Synapsin 1 je jedini isključivo presinaptički protein. Synapsin se u stanici nalazi pridružen membrani sinaptičkih mjehurića. Slijedom toga Synapsin 1 signal se u kulturi uglavnom može naći u aksonima neurona, a počinje jačati od trećeg dana diferencijacije nadalje (slika 10A-F). GFAP+ astroglijalne stanice ne izražavaju navedeni sinaptički protein.

#### b) Western blot

Kao i kod ostalih sinaptičkih proteina izražaj Synapsin-a 1 u kulturi tijekom diferencijacije raste, i to oko 6 puta. U posljednjem analiziranom stadiju, sedmog dana diferencijacije signal je i dalje oko 6 puta slabiji u odnosu na kontrolni odrasli mišji mozak (11A i B).



Slika 10. Imunocitokemijski prikaz porasta izražaja sinaptičkog markera Synapsin 1 tijekom *in vitro* diferencijacije ŽMS. Synapsin 1 je odsutan u citoplazmi nediferenciranih ŽMS, a njegov signal raste tijekom diferencijacije. (A-C) Synapsin 1 je signal je negativan u nediferenciranim nestin+ ŽMS nultog dana diferencijacije (30 minuta nakon nasađivanja). (D-F) Prikaz Synapsin 1 signala u aksonima Map2+ neurona petog dana diferencijacije.



Slika 11. Usporedba izražaja sinaptičkih markera u kulturi ŽMS tijekom *in vitro* diferencijacije (vremenske točke: 1 dan, 3 dana, 5 dana i 7 dana) te odraslog mišjeg mozga Western blotom.

Rezultati pokazuju značajno povećanje ekspresije svih analiziranih sinaptičkih markera sedmog dana diferencijacije u odnosu na prvi (\* $P < 0,05$ ,  $n=4$ ). (A) Reprezentativni blot Synapsina 1 čija je razina izražaja semi-kvantificirana i prikazana u (B). (C) Reprezentativni blot neuroligina 1 čija je razina izražaja semi-kvantificirana i prikazana u (D). (E) Reprezentativni blot PSD95 čija je razina izražaja semi-kvantificirana i prikazana u (F). (G) Reprezentativni blot SynCAM 1 čija je razina izražaja semi-kvantificirana i prikazana u (H).

---

## **4.2. Obilježavanje embrionalnih živčanih matičnih stanica i utjecaj obilježavanja na njihova svojstva**

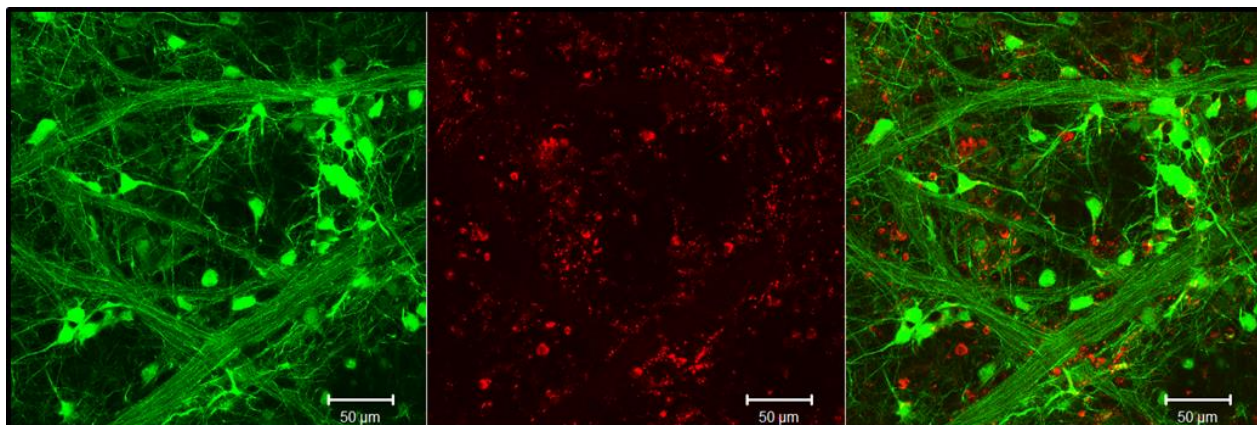
### **4.2.1. Obilježavanje živčanih matičnih stanica bojom PKH26 te njihova karakterizacija**

PKH26 je lipofilna boja koja obilježava stanice ugradnjom u membranu te manjim dijelom ulaskom u citoplazmatske vakuole fagocitozom. Sam postupak obilježavanja uključuje inkubaciju stanica u otopini PKH26 boje kroz 5-10 minuta. Nakon što se višak boje koja se nije vezala ukloni pomoću seruma te centrifugiranja, suspenzija obilježenih stanica spremna je za daljnju uporabu. Postotak stanica obilježenih PKH26 bojom nakon ovakvog postupka je visok,  $>90\%$  ukupnog broja stanica.

#### Svojstva ŽMS obilježenih s PKH26

Kako bismo provjerili utjecaj PKH26 na diferencijaciju ŽMS-a napravili smo usporedbu kontrolnih i PKH26 obilježenih stanica tijekom devet dana *in vitro* uzgoja. Broj THY1 pozitivnih stanica (specifičan marker neurona) nije se značajno razlikovao u kulturi PKH26 pozitivnih stanica u odnosu na kontrolnu u svim analiziranim vremenskim točkama (slika 12). Time smo potvrdili pretpostavku da boja PKH26 ne mijenja diferencijacijsku sudbinu obilježenih ŽMS.





Slika 12. ŽMS obilježene bojom PKH26 se diferenciraju jednako kao i neobilježene – kontrolne stanice. (A-C) Prikaz kulture PKH26+ ŽMS nakon 9 dana *in vitro* diferencijacije.

#### 4.2.2. Obilježavanje živčanih matičnih stanica BrdU-om te njihova karakterizacija

Budući da se boja PKH26 integrira u membranu te ulazi u citoplazmu, stanična diferencijacija koja uključuje povećanje membranske površine i volumena citoplazme dovodi do pada u intenzitetu PKH26 signala. Zbog toga je dugotrajnije praćenje PKH26 obilježenih stanica u transplantacijskim studijama bilo otežano. Slijedom toga, odlučili smo se upotrijebiti BrdU za obilježavanje stanica budući da se BrdU veže direktno na molekulu DNA te na taj način pruža mogućnost pouzdanijeg praćenja transplantiranih stanica, čak i nakon nekoliko tjedana. Istovremeno smo pretpostavili kako zbog direktnog vezivanja za DNA, BrdU može potencijalno, za razliku od PKH26 boje, imati utjecaj na diferencijacijski i/ili proliferacijski potencijal ŽMS-a. Kako bismo to provjerili, napravili smo usporedbu navedenih svojstava između neobilježenih i obilježenih ŽMS.

### Svojstva ŽMS obilježenih s BrdU

#### a) Razlika u proliferacijskom potencijalu ŽMS

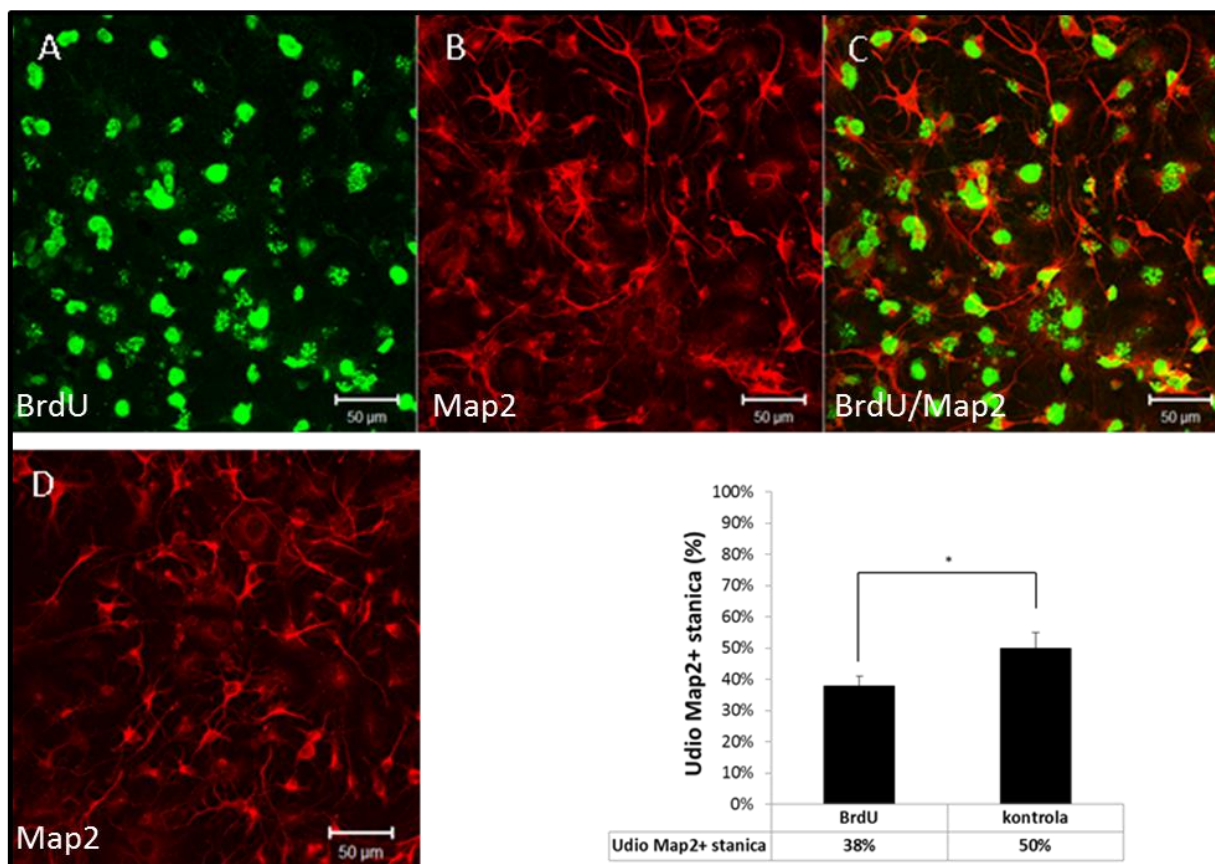
Kako bismo odredili proliferacijski potencijal ŽMS obilježenih s BrdU-om te ga usporedili s kontrolnim neobilježenim stanicama, uzgajali smo obje vrste stanica u suspenziji i u adherentnoj kulturi uz prisutnost epidermalnog i fibroblastnog čimbenika rasta. Nakon toga smo usporedili prosječne veličine neurosfera stanica uzgajanih u suspenziji, a pomoću Ki67 antigena smo analizirali umnažanje adherentno uzgajanih stanica.

Rezultati su pokazali da je prosječna veličina neurosfera nakon 48 sati proliferacije BrdU+ ŽMS oko 25  $\mu\text{m}$ , a u kontrolnoj grupi oko 50  $\mu\text{m}$ . Ovaj nalaz je pokazao da postoji razlika u proliferacijskom potencijalu između ove dvije grupe te da je on veći kod neobilježenih stanica.

Imunocitokemijska analiza je pokazala da je u grupi BrdU+ ŽMS oko 90% stanica Ki67 pozitivno, dok je u kontrolnoj grupi taj postotak oko 98%. Time smo dodatno potvrdili smanjenu proliferacijsku sposobnost BrdU+ ŽMS.

#### b) Razlika u diferencijacijskom potencijalu ŽMS

Kako bismo provjerili u kojoj mjeri BrdU može utjecati na diferencijaciju ŽMS ponovno smo usporedili neobilježene i obilježene ŽMS tijekom *in vitro* uzgoja u dvije vremenske točke, nakon 24 sata i 72 sata diferencijacije. Analiza Map2, biljega neurona je pokazala da BrdU pozitivne stanice imaju smanjenu sposobnost diferencijacije u neurone pa je tako postotak neurona u kulturi BrdU+ stanica oko 12% manji u odnosu na kontrolnu kulturu neobilježenih stanica (slika 13). Iako je udio GFAP+ stanica sličan u obje kulture, vidljive su razlike u morfologiji astrocita koji u BrdU+ kulturi imaju duže i razgranatije izdanke.



Slika 13. Usporedba diferencijacijskog potencijala ŽMS obilježenih s BrdU te kontrolnih neobilježenih. BrdU+ ŽMS imaju smanjenu sposobnost diferencijacije u neurone, postotak neurona je u kulturi BrdU+ stanica značajno manji u odnosu na kontrolu (\*P<0,05) (E). (A-C) Prikaz BrdU obilježenih ŽMS nakon tri dana diferencijacije. (D) Prikaz neobilježenih ŽMS nakon tri dana diferencijacije.

### **4.3. Transplantacija živčanih matičnih stanica u oštećeno i zdravo tkivo**

Kako bismo stekli bolji uvid u ponašanje stanica nakon transplantacije stereotaksijski smo transplantirali obilježene ŽMS u miševe kod kojih smo 24 sata ranije izazvali ishemijski moždani udar. Istovremeno smo stanice transplantirali i u zdrave miševe kako bismo usporedbom rezultata identificirali učinak same ozljede na stanice. Stanice smo paralelno transplantirali na nekoliko različitih mjesta unutar tkiva: striatum, intracerebroventrikularno te u područje corpusa callosa u ipsilateralnoj hemisferi zahvaćenoj ishemijom. Usporedbom dobivenih rezultata smo identificirali najbolje mjesto za transplantaciju. Kod same analize uspoređivali smo nekoliko parametara: preživljenje transplantiranih stanica, stupanj diferencijacije i izražaj sinaptičkih biljega.

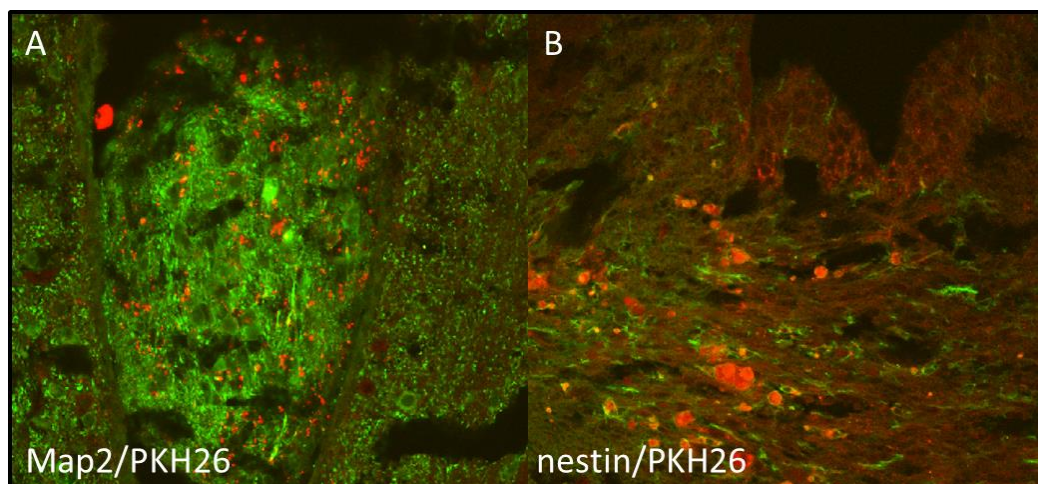
Za praćenje stanica smo koristili egzogene obilježivače PKH26 i BrdU, te endogeni biljeg Thy1-YFP. Korištene su ŽMS Tg(Thy1-YFP)16Jrs transgeničnih miševa koji u oko 20% neurona konstitutivno izražavaju YFP. Četiri tjedna kasnije transplantirana tkiva smo imunohistokemijski obojali te analizirali konfokalnim mikroskopom.

#### **4.3.1. Transplantacija PKH26+ živčanih matičnih stanica u oštećeno i zdravo tkivo**

##### **4.3.1.1. Transplantacija u komore**

Živčane matične stanice obilježene bojom PKH26 transplantirali smo u lateralne komore miševa ozlijeđenih ishemijom te u njihove zdrave kontrole.

Analiza tkiva 4 tjedna nakon transplantacije je pokazala da stanice transplantirane u moždane komore u velikom broju preživljavaju i kod ozlijeđenih i kod zdravih miševa. Preživjele stanice se velikim dijelom zadržavaju u cerebrospinalnom likvoru komora formirajući neurosfere, dok se jedan manji dio stanica, ali samo kod miševa zahvaćenih moždanim udarom, može naći kako iz likvora prelazi ponovno u tkivo (slika 14).

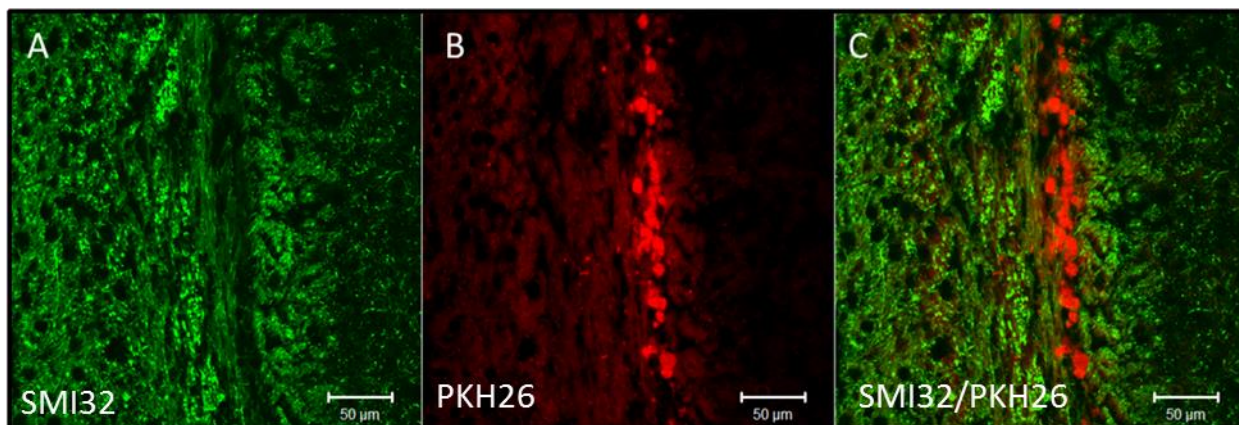


Slika 14. Imunohistokemijski prikaz ŽMS transplantiranih u komore. Dok se veliki broj stanica zadržao u komori gdje je vidljiva i diferencijacija u Map2+ neurone, jedan dio stanica migrira iz komora u tkivo. (A) prikaz PKH26+Map2+ stanica u komori, (B) prikaz migracije PKH26+nestin+ stanica iz komore natrag u tkivo.

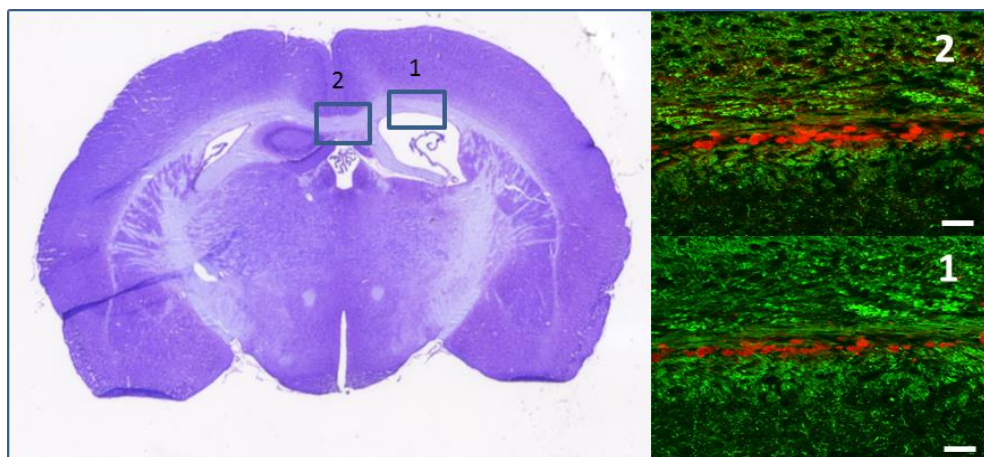
#### 4.3.1.2. Transplantacija u corpus callosum

Nakon transplantacije u corpus callosum (CC) na mjestu udaljenom od ishemije, stanice migriraju uz vlakna na obje strane, prema ozljedi i na suprotnu stranu (slika 15 i 16). Osim u ozlijeđenom tkivu, slična migracijska sposobnost vidljiva je i kod stanica transplantiranih u zdrave miševе. Ipak, kod ozlijeđenog tkiva stanice pokazuju nešto veću sklonost migraciji prema ozlijeđenoj strani. Unatoč migraciji prema ozljedi niti jedan od analiziranih uzoraka u kojem su stanice transplantirane u corpus callosum nije pokazao značajnije nakupljanje PKH26 pozitivnih stanica na samom mjestu ozljede.





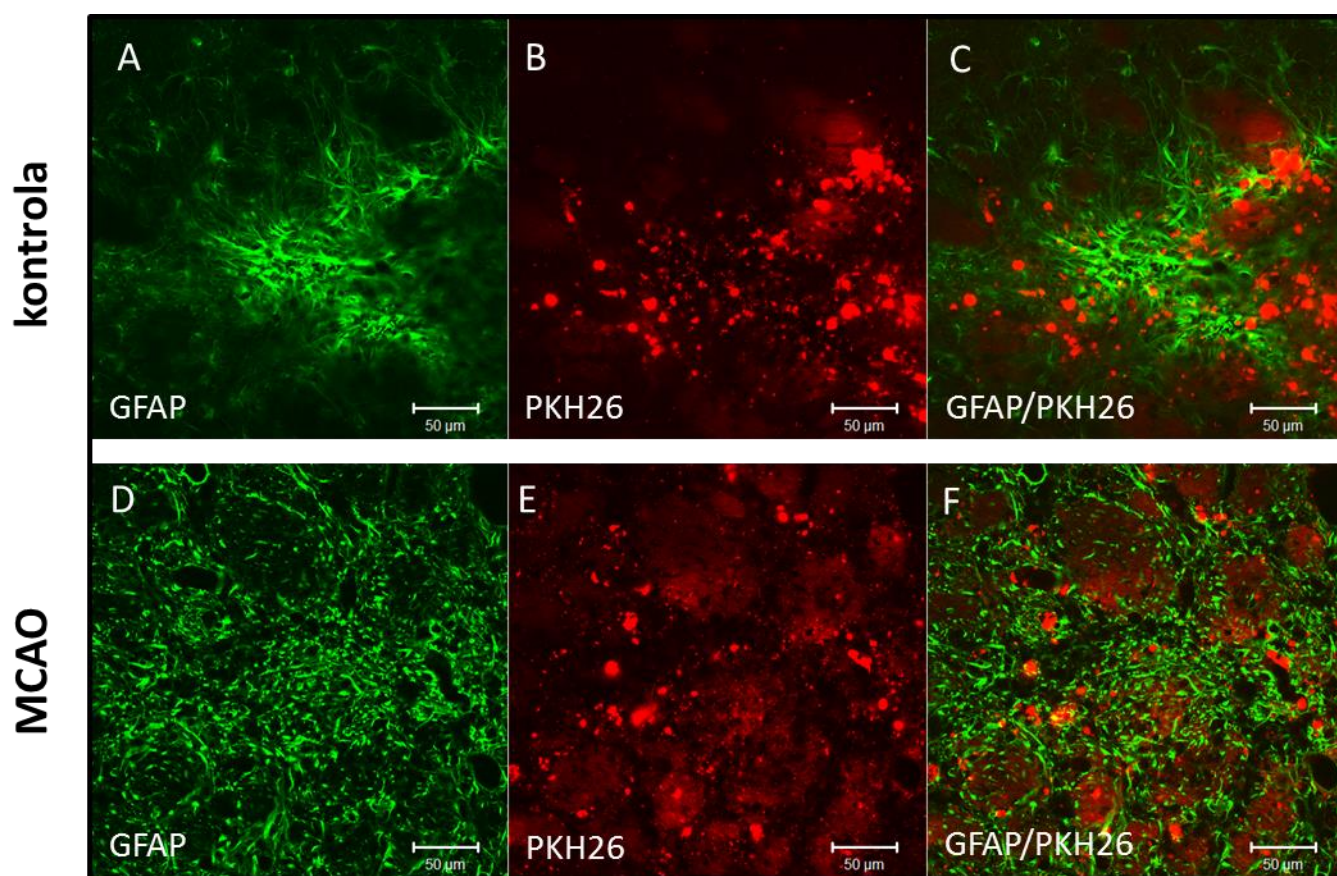
Slika 15. (A-C) Imunohistokemijski prikaz migracije PKH26+ ŽMS uz SMI32 pozitivna vlakna



Slika 16. Prikaz Nissl obojanog MCAO mozga s detaljnijim smještajem migrirajućih PKH26+ stanica u isječcima (1) i (2).

#### 4.3.1.3. Transplantacija u striatum

Analizirana tkiva pokazala su da stanice transplantirane u striatum, primarno zahvaćen ishemijom u korištenom modelu moždanog udara, preživljavaju u velikom broju na mjestu ozljede čak i nakon četiri tjedna. Preživljavanje transplantiranih stanica vidljivo je kako u ozlijeđenom tako i u zdravom tkivu. Ipak, preživjele stanice u ozlijeđenom tkivu se ponašaju drugačije. U ozlijeđenom tkivu PKH26 pozitivne stanice se više razilaze, pa su smještene uglavnom pojedinačno (slika 17D-F). U zdravom tkivu ostaju u nakupinama (slika 17A-C). Osim toga broj preživjelih stanica u ozlijeđenom tkivu je u usporedbi sa zdravim mozgom veći.



Slika 17. Usporedba stanica transplantiranih u MCAO i kontrolno zdravo moždano tkivo. Vidljivo je puno veće razilaženje PKH26+ stanica u ozlijeđenom tkivu u odnosu na zdravo gdje

su većim dijelom u nakupinama. Osim toga vide se i jasne razlike u organizacije GFAP+ ožiljka koji je u zdravom tkivu lokaliziran isključivo oko mjesta uboda. (A-C) Prikaz PKH26+ stanica i GFAP+ astrocita u zdravom kontrolnom tkivu, (D-F) prikaz PKH26+ stanica i GFAP+ astrocita u MCAO tkivu.

---

#### **4.3.2. Transplantacija BrdU+ živčanih matičnih stanica u oštećeni i zdravi striatum**

Budući da su pokusi s PKH26 pozitivnim stanicama pokazali veliki broj preživjelih i integriranih stanica na mjestu ozlijede prilikom transplantacije u striatum, odlučili smo stanice ponovno transplantirati na isto mjesto, ali ih prethodno obilježiti s trajnijim obilježivačem (BrdU) kako bismo napravili dodatnu kvantitativnu analizu transplantata. Četiri tjedna nakon transplantacije, analizirali smo slijedeće parametre: veličinu graftova, staničnu proliferaciju, diferencijaciju i izražaj sinaptičkih biljega.

##### **4.3.2.1. Usporedba veličine**

Prebrojavanjem BrdU+ stanica na svakom drugom rezu kroz čitavi graft pronašli smo 2-3 puta veći broj transplantiranih stanica u ozlijeđenom tkivu u odnosu na zdravo tkivo. Jednako kao i kod transplantacije PKH26+ stanica, u ozlijeđenom tkivu se transplantirane stanice više razmiču te smještaju pojedinačno (slika 18A, D i G).



#### **4.3.2.2. Usporedba proliferacije**

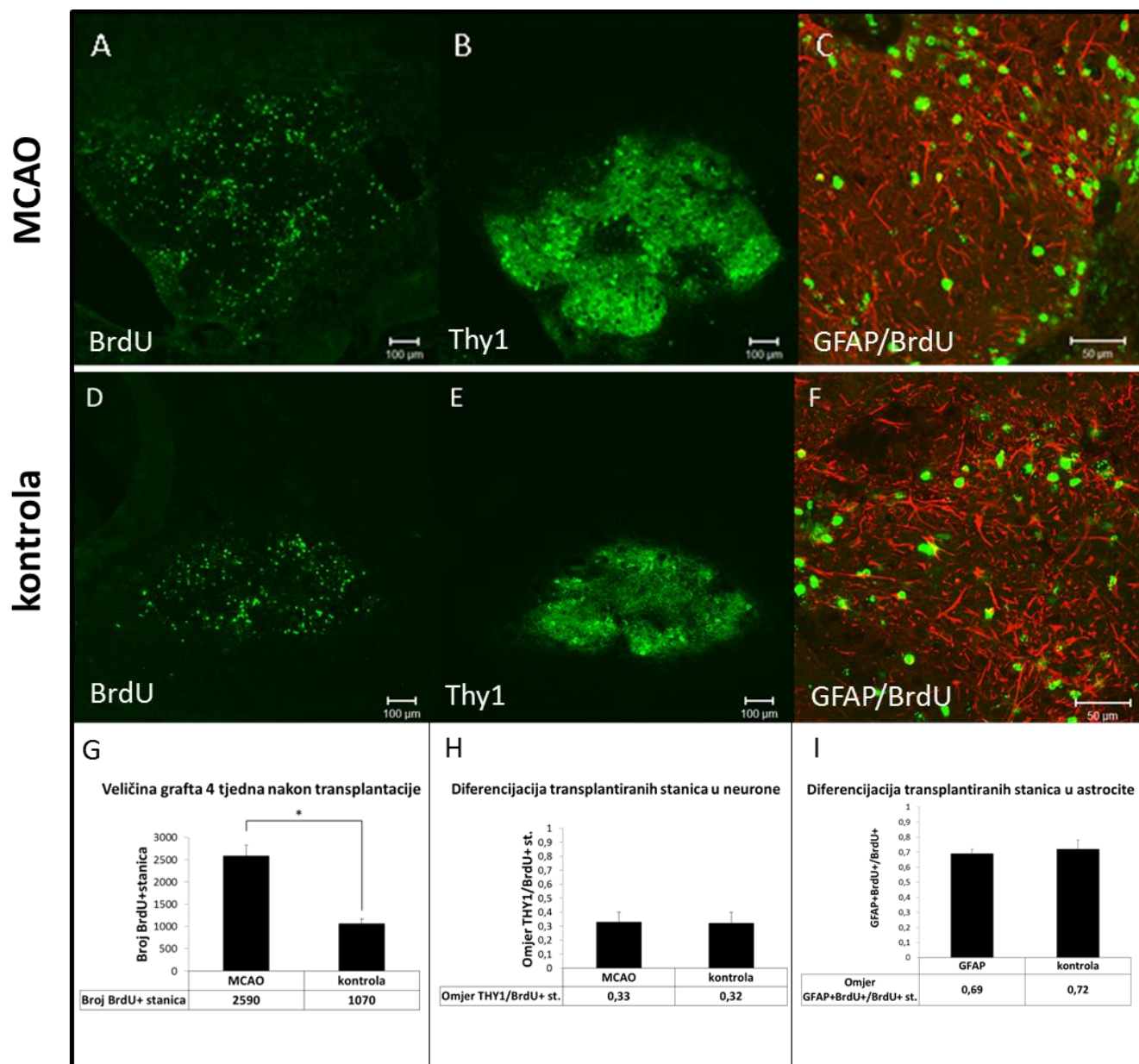
Budući da je graft u oštećenom tkivu mnogo veći u odnosu na zdravo tkivo, odlučili smo analizirati proliferaciju transplantiranih stanica pomoću biljega Ki67.

Analiza izražaja biljega Ki67 je pokazala da nakon četiri tjedna vrlo maleni postotak transplantiranih stanica (manje od 2%) zadržava proliferacijsku sposobnost, te se taj postotak ne razlikuje u ozlijeđenom, u odnosu na zdravo tkivo. Iz navedenog zaključujemo kako uzrok razlike u veličini grafta između ozlijeđenog i zdravog tkiva nije u većoj proliferaciji transplantiranih stanica u ozlijeđenom tkivu nego u njihovom boljem preživljenju.

#### **4.3.2.3. Usporedba diferencijacije**

Kako bismo utvrdili diferencijacijsku sposobnost transplantiranih stanica u zdravom i u ozlijeđenom tkivu, odredili smo udio Thy1+ neurona te GFAP+ astrocita u obje grupe. U analizi smo se usredotočili na stanice pojedinačno smještene odmaknute od većih staničnih nakupina. To je učinjeno zato što je analiza stanica u nakupinama otežana, te zato što u diferencijaciju uglavnom ulaze pojedinačne stanice. Zaista, pokazali smo da, agregirane stanice uglavnom ostaju u nediferenciranom Sox2 pozitivnom obliku.

Rezultati su pokazali da ne postoji značajna razlika u postotku diferenciranih neurona niti astrocita u ozlijeđenom i zdravom tkivu (omjer Thy1+/BrdU+ u ozlijeđenom tkivu je 0,33, a u zdravom 0,32, dok je omjer GFAP+BrdU+/BrdU+ u ozlijeđenom 0,69, a u zdravom 0,72) (slika 18B, C, E, F, H, I). Sličnost u diferencijaciji ukazuje na mogućnost da diferencijacija ŽMS nakon transplantacije većim dijelom ovisi o samim osobinama stanica, a manjim o okolini koja ih okružuje.



Slika 18. Usporedba preživljenja i diferencijacije transplantiranih stanica u MCAO i zdravom kontrolnom moždanom tkivu. Transplantirane stanice preživljavaju u oko 2-3 puta većem broju u ozlijeđenom tkivu u odnosu na zdravo, rezultati prikazani u (G) ( $n=4$ ,  $*P<0,05$ ). Istovremeno udio transplantiranih stanica koje se diferenciraju u neurone i astrocite se ne razlikuje u MCAO i zdravom tkivu, rezultati prikazani u (H) i (I). ( $n=4$ ). Prikaz u ozlijeđenom tkivu (A) transplantiranih BrdU+ stanica, (B) diferenciranih Thy1+ neurona i (C) kolokaliziranih

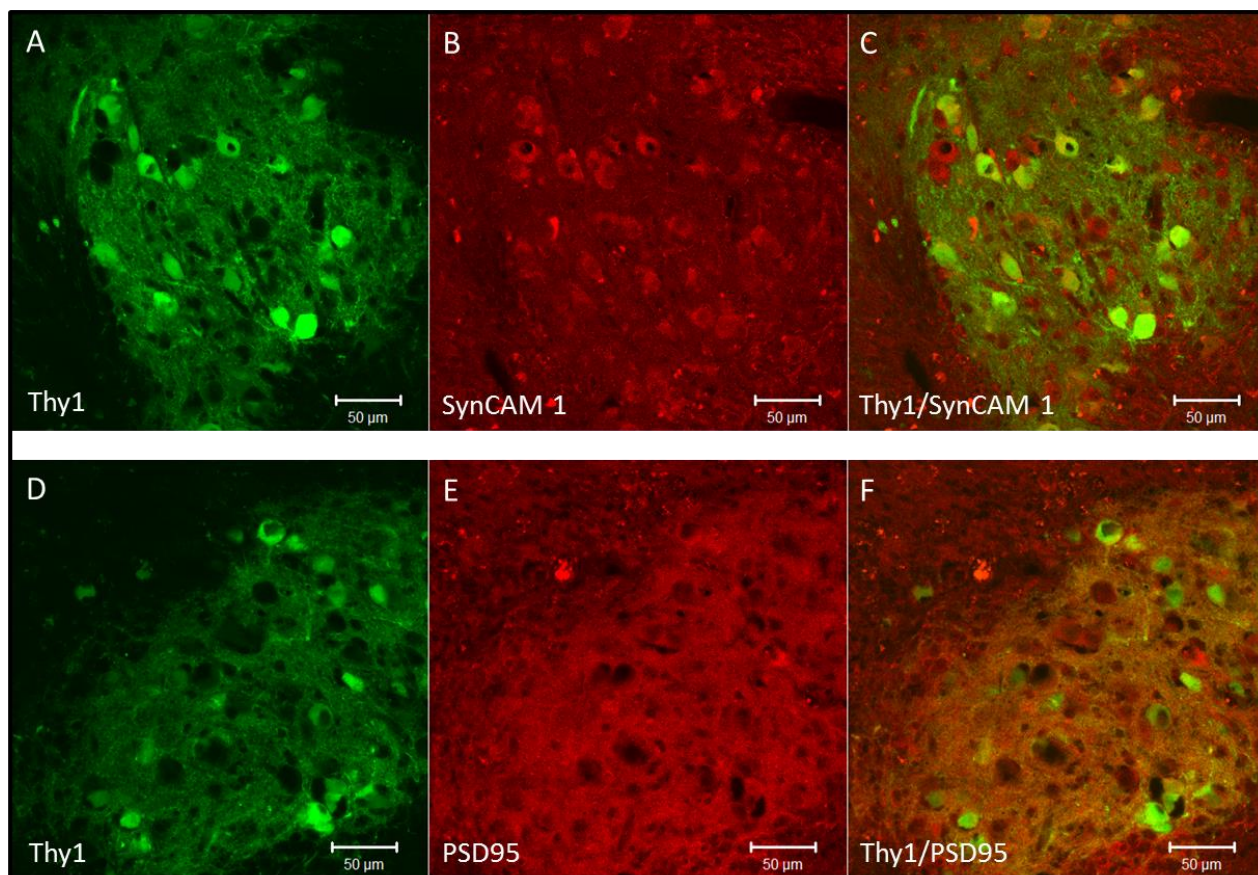
GFAP+BrdU+ stanica. Prikaz u zdravom tkivu (D) transplantiranih BrdU+ stanica, (E) diferenciranih Thy1+ neurona i (F) kolokaliziranih GFAP+BrdU+ stanica.

---

#### **4.3.2.4. Usporedba izražaja sinaptičkih biljega**

Osim diferencijacije za uspješnu integraciju transplantiranih stanica je potrebno i njihovo međusobno sinaptičko povezivanje. Kako bismo provjerili sposobnost naših transplantiranih stanica za stvaranje sinapsi, analizirali smo izražaj sinaptičkih proteina. Kao reprezentativne i pouzdane pokazatelje sinaptogeneze, odabrali smo post-sinaptičke biljege ranih sinapsi neuroligin 1 i SynCAM 1, te marker kasne sinapse PSD95.

Rezultati su pokazali da transplantirane ŽMS imaju sposobnost stvaranja sinaptičkih proteina u oštećenom i u zdravom tkivu. Pritom se sinaptički proteini uglavnom nalaze u diferenciranim stanicama transplantata, pa tako Thy1+ neuroni pokazuju intenzivan SynCAM 1 signal i to pretežno perinuklearno, sa slabijom distribucijom u nastavcima (slika 19A-C). Signal neuroligina 1 se uglavnom nalazi u nastavcima Thy1+ neurona, a slabije u tijelima stanica. Biljeg kasne sinapse PSD95 podjednako boji i perinuklearnu citoplazmu i početne dijelove nastavaka (slika 19D-F). Navedena distribucija signala u diferenciranim neuronima transplantata je slična izražaju sinaptičkih biljega u neuronima nastalim tijekom in vitro diferencijacije ŽMS.



Slika 19. Kolokalizacija sinaptičkih markera i transplantiranih stanica. SynCAM 1 i PSD95 pokazuju jak signal u području transplantiranih stanica diferenciranih u Thy1+ neurone. (A-C) SynCAM 1 signal u citoplazmi tijela Thy1+ neurona. (D-F) PSD95 signal u tijelima i nastavcima Thy1+ neurona.

#### 4.4. Reaktivne promjene u postishemijskom moždanom tkivu

Za potpuno razumijevanje terapijskog učinka ŽMS potrebno je razjasniti i događaje u postishemijskom tkivu koji nastaju kao dio normalnog odgovora tkiva na ozljedu.

Stoga smo analizirali tkivo te posebnu pozornost obratili na reaktivnu gliozu, angiogenezu, izrastanje aksona te proliferaciju ŽMS. Osim toga, analizirali smo i izražaj sinaptičkih biljega kako bismo procijenili stupanj oporavka samih sinapsi.

#### **4.4.1. Proliferacija astrocita (reaktivna gliozu)**

Imunohistokemijska analiza tkiva četiri tjedna nakon ishemijske ozljede pokazuje jaki reaktivni odgovor glija stanica obilježen hipertrofijom astrocita te izrazitim porastom ekspresije intermedijarnog filamena GFAP. Hipertrofični astrociti pritom čine gustu mrežu filamentoznih nastavaka kojima oblikuju jasnu granicu između penumbre i jezgre ishemijske ozljede (slika 20A).

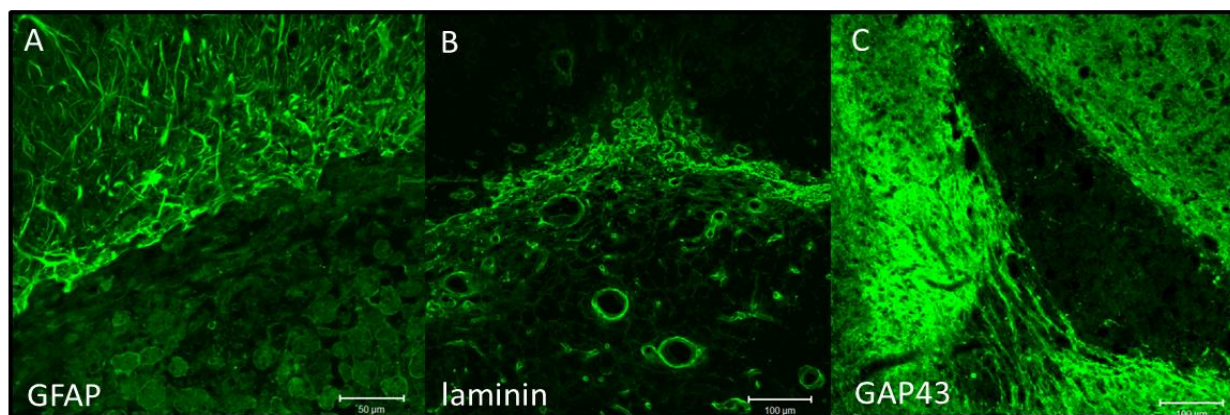
#### **4.4.2. Rast novih krvnih žila**

Laminin je glikoprotein koji se nalazi u bazalnoj membrani te je poznat kao jedan od najboljih biljega krvnih žila u mozgu. Imunohistokemija anti-laminin protutijelom pokazuje obilje laminina u leziji (slika 20B). Neke od laminin pozitivnih struktura jasno odgovaraju oblikom krvnim žilama. Osim krvnih žila, dio pozitivnog signala odgovara i stanicama NG2 glije koje su, uz krvne žile, također pozitivne za laminin.

#### **4.4.3. Rast aksona**

GAP43 protein je biljeg rastućih aksona. Imunohistokemija primjenom GAP43 protutijela je pokazala da novonastali aksoni mogu premostiti ozlijeđu (slika 20C). Takva mjesta se obično nalaze na rubu ozljede gdje su prisutni pogodniji uvjeti u smislu ravnoteže permissivnih i inhibitornih faktora.





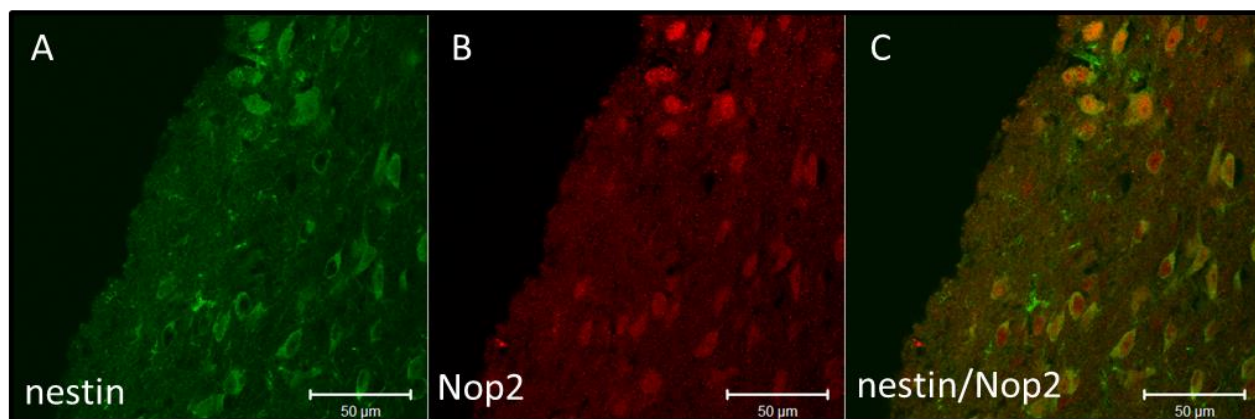
Slika 20. Imunohistokemijski prikaz reaktivnih promjena u postishemijskom moždanom tkivu. (A) reaktivna gliozna s GFAP+ astrocitima, (B) reaktivna angiogeneza s laminin+ krvnim žilama i (C) urastanje GAP43+ aksona.

#### 4.4.4. Proliferacija živčanih matičnih stanica - Nop2 kao biljeg proliferacije živčanih matičnih stanica

U sklopu oporavka tkiva, pokazali smo i jak porast izražaja nestina. Jedan dio nestin+ stanica morfološki nalikuju na nezrele neurone, a drugi dio na prekursore glija stanica. Pozitivne stanice se mogu naći obilno u SVZ i u penumbri, na različitim udaljenostima od same lezije.

Nop2 je gen koji je do sada uglavnom korišten kao biljeg tumorskih stanica. Osim toga, naša grupa je objavila rad u kojem opisujemo njegovu prisutnost i u odraslim zrelim neuronima. Obzirom na njegov izražaj u stanicama s intenzivnom izgradnjom proteina, odlučili smo analizirati izražaj Nop2 i u ŽMS. U postishemijskom tkivu se vidi jaki porast Nop2 signala, i to uglavnom u nestin+ stanicama (slika 21). Analiza BrdU-om pokazuje kolokalizaciju BrdU i Nop2. Time smo potvrdili prisutnost Nop2 signala u novonastalim stanicama u postishemijskom

moždanom tkivu. Navedeni rezultati dokazuju mogućnost primjene Nop2 kao biljega proliferacije ŽMS.



Slika 21. (A-C) Imunohistokemijski prikaz kolokalizacije Nop2 i nestin signala u progenitorima koji morfološki nalikuju na nezrele neurone.

---

#### 4.4.5. Rast izražaja sinaptičkih biljega

Plastičnost moždanog tkiva nakon ishemije može dovesti do djelomičnog oporavka funkcije nakon moždanog udara. Kako bismo procijenili plastičnost mišjeg mozga odnosno mogućnost oporavka sinapsi nakon ishemijske ozljede analizirali smo izražaj sinaptičkih biljega (SynCAM 1, neuroligin 1 i PSD95) 2, 4 i 8 tjedana nakon ishemijske ozljede.

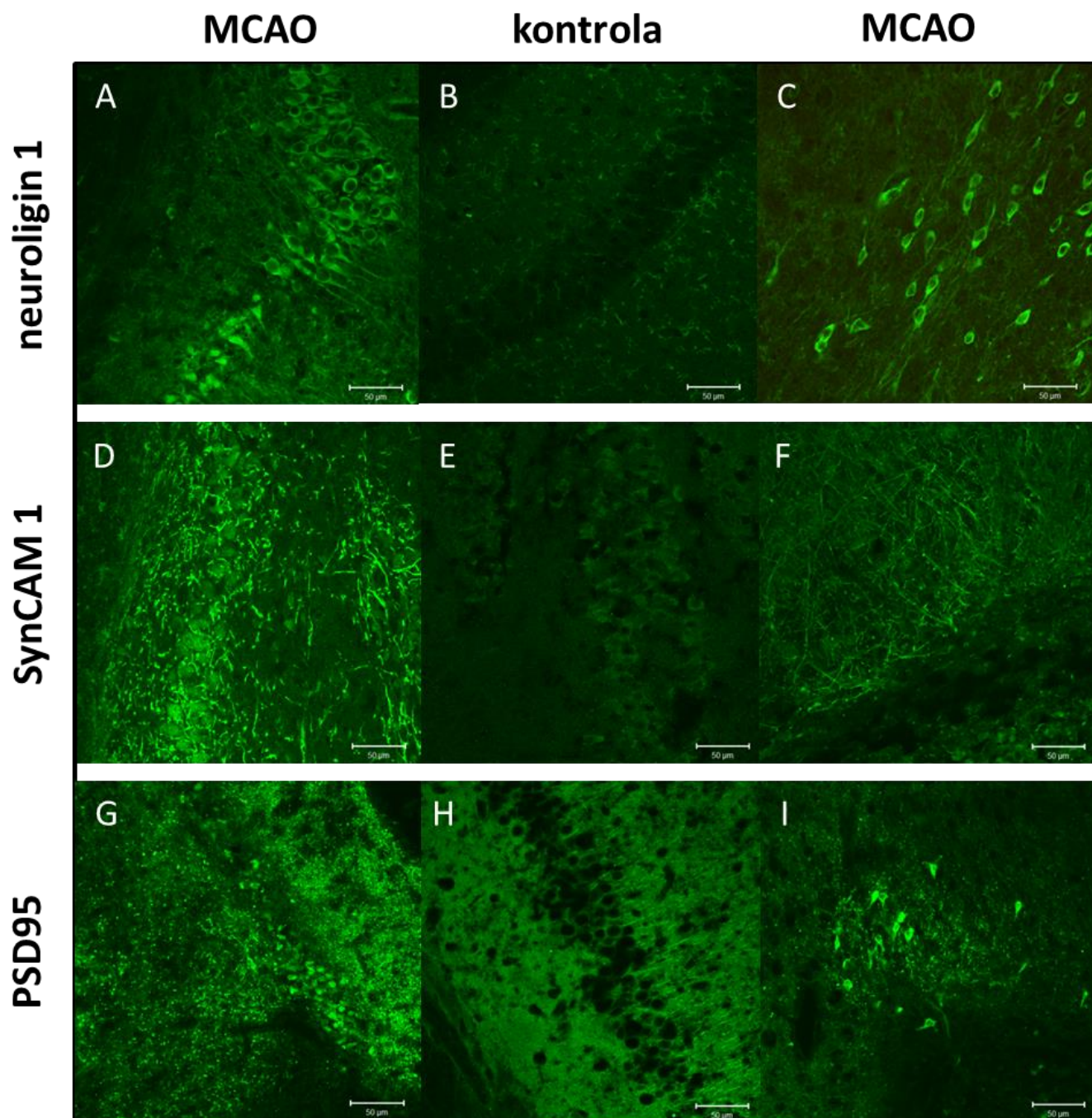
Izražaj svih navedenih sinaptičkih biljega raste, te je porast vidljiv u obje hemisfere. Na strani ozljede signal raste u tkivu oko same ozljede (slika 22F), a u suprotnoj hemisferi na mjestu analognom području zahvaćenom ishemijom. Kod nekih životinja smo uočili da izražaj raste i u

području talamusa. U slučajevima kada je hipokampus oštećen vidi se i jak porast signala u njemu (slika 22D i G).

Navedeni porast izražaja sinaptičkih biljega se uglavnom može prepoznati i povezati s rastućim nastavcima koji se ili pružaju prema ozlijeđenom području ili rastu na kontralateralnoj strani kao kompenzacija ozlijeđenom području.

Osim toga izražaj sinaptičkih biljega raste i zahvaljujući progenitornim stanicama koje izgledom nalikuju na nezrele neurone, a mogu se jasno mogu prepoznati u penumbri i hipokampusu nekih miševa (na slici 22I vidljive su PSD95 pozitivne stanice smještene na samom rubu penumbre, na slici 22C neuroligin 1 pozitivni progenitori koji su još u fazi migracije prema ozljedi, a na slici 22A ozlijeđeni hipokampus s velikim brojem neuroligin 1 pozitivnih progenitora).





Slika 22. Imunohistokemijska usporedba izražaja sinaptičkih biljega u ishemijski ozlijeđenom tkivu te kontrolnom neozlijeđenom moždanom tkivu. Vidljiv je porast intenziteta svih analiziranih markera u ishemijskom tkivu u odnosu na neozlijeđeno tkivo, i to prije svega u

nastavcima koji okružuju ozljedu te novostvorenim progenitorima. Neuroligin 1 – (A) i (C) ozlijeđeni hipokampus i korteks s mnoštvom novostvorenih neuroligin 1+ progenitora, (B) kontrolni neozlijeđeni hipokampus s mnogo slabijim neuroligin 1 signalom. SynCAM 1 – (D) i (F) ozlijeđeni hipokampus i korteks s intenzivnim SynCAM 1 signalom u nastavcima, (E) kontrolni neozlijeđeni hipokampus s mnogo slabijim SynCAM 1 signalom. PSD95 – (G) ozlijeđeni hipokampus s porastom PSD95 signala u nastavcima, (H) kontrolni neozlijeđeni hipokampus sa slabijim PSD95 signalom, (I) PSD95+ progenitori u penumbri blizu jezgre kortikalne ozljede.

---

## **5. Rasprava**

### **5.1. In vitro karakterizacija živčanih matičnih stanica**

Embrionalne živčane matične stanice predstavljaju heterogenu skupinu progenitora u različitim stadijima i stanica koje nazivamo živčanim matičnim stanicama u strožem smislu. One se prvi puta javljaju u embrionalnom moždanom tkivu u stadiju E10,5 razvoja zametka miša u trenutku početka razvoja neuroepitelnog tkiva.

Iz neuroepitelnog tkiva se tijekom embrionalnog razvoja stvaraju ostale vrste živčanih matičnih stanica, pa tako u stadiju E14,5 razlikujemo apikalnu i bazalnu radijalnu gliju, zatim brzo proliferirajuće te intermedijarne progenitorne stanice. Sve te stanice dijele zajednička obilježja, proliferacijsku sposobnost te veći ili manji stupanj multipotentnosti.[51,52,53]

#### **5.1.1. Proliferacijski potencijal živčanih matičnih stanica**

Embrionalne ŽMS izolirane iz stadija E14,5 razvoja zametka miša reagiraju na epidermalni i fibroblastni čimbenik rasta proliferacijom. Ovim istraživanjem smo potvrdili ta opažanja. Dodavanje navedenih čimbenika je imalo za posljedicu brzu proliferaciju stanica te oblikovanje neurosfera koje su se kontinuirano povećavale. Povećanje je išlo do stadija promjera neurosfera od oko 100-150  $\mu\text{m}$ . Kada su neurosfere ostavljene da dalje proliferiraju, u sredini neurosfera je dolazilo do odumiranja stanica zbog nemogućnosti difuzije kisika i hranjivih tvari kroz prevelik broj slojeva stanica. Stoga su u našem istraživanju disocirane neurosfere prosječnog promjera oko 50-100  $\mu\text{m}$ .

Za proliferacijsku sposobnost ŽMS odgovorni su odgovarajući EGF i FGF receptori smješteni na površini stanica, a njihovo je postojanje potvrđeno mnogobrojnim dosadašnjim istraživanjima.[54,55,56]

Imura i suradnici su u svojem istraživanju pokazali da u formiranju neurosfera sudjeluje heterogena skupina stanica. Uklanjanjem GFAP+ radijalne glije u stadiju E15,5 doveli su do smanjenja broja neurosfera za 50% te time potvrdili da i ostale ŽMS poput proliferajućih ili intermedijarnih progenitora i bazalne glije u većoj ili manjoj mjeri doprinose formiranju neurosfera.[57]

Postojanje EFG reaktivnih stanica u odraslom tkivu dokazali su Doetsch i suradnici koji su u subventrikularnoj zoni (SVZ) pronašli dvije skupine EGFR+ stanica, EGFR+GFAP+ i EGFR+DCX-. Prva skupina svojim obilježjima odgovara aktiviranim astrocitima, a druga proliferirajućim progenitorima (C stanicama). Navedene stanice su *u in vitro* proliferacijskim uvjetima stvarale neurosfere.[58]

### **5.1.2. Diferencijacijski potencijal živčanih matičnih stanica**

Embrionalne ŽMS izolirane iz stadija E14,5 uzgajane u našim uvjetima bez seruma diferenciraju se velikim dijelom u neurone te manjim u astrocite. Udio diferenciranih stanica u kulturi je kako vrijeme odmiče sve veći, no udio nestin+ ŽMS je i nakon tjedan dana diferencijacije oko 30%.

Provedena istraživanja su pokazala da izolirane ŽMS kod *in vitro* uzgoja bez seruma slijede svoj *in vivo* diferencijacijski obrazac. Opažena činjenica da ŽMS iz stadija E14,5 uzgajane bez seruma daju veliki udio neurona jest očekivana, budući da u *in vivo* uvjetima tada nastupa vrhunac neurogeneze.[59]

Ukoliko je u kulturu bio dodan serum, udio astrocita se značajno povećavao. Navedeno se povezuje s nizom morfogenata prisutnih u serumu, a koji putem utjecaja na Notch signalni put imaju sposobnost mijenjanja sudbine živčanih matičnih stanica. Morfogeni djeluju na manje diferencirane stanice poput radijalne glije, ali i na progenitore već usmjerene prema neuronalnoj sudbini.[60,61,62]

### 5.1.3. Sinaptički potencijal živčanih matičnih stanica

Osim diferencijacije, ŽMS tijekom sazrijevanja prolaze i kroz veoma važan proces sinaptogeneze. U skladu s time ŽMS uzgajane u našim uvjetima pokazuju izražaj analiziranih sinaptičkih markera neuroligin 1, SynCAM 1, PSD95 i Synapsin 1 već od samog početka, a intenzitet navedenih markera postepeno raste kako diferencijacija napreduje.

Neuroligin 1 i SynCAM 1 predstavljaju dva sinaptička proteina dokazano sposobna inducirati formiranje sinapsi.[63] Neuroligin 1 je postsinaptički transmembranski protein koji se veže za presinaptički receptor  $\beta$ -neurexin. Za kompleks neuroligin-neurexin je pokazano kako je dovoljan za induciranje sinaptičke veze.[64,65]

Za razliku od neuroligina 1 SynCAM 1 je adhezivna homofilna molekula koja, međutim, kao i neuroligin 1 može potaknuti formiranje glutamat oslobađajućih presinaptičkih terminala čak i kada je izražen u ne-neuronalnim stanicama.[66] Osim ovih sličnosti i neuroligin 1 i SynCAM 1 imaju svaki svoje osobitosti, pa tako neuroligin 1 povećava broj novostvorenih sinapsi, ali onih ne-funkcionalnih, dok SynCAM 1 pojačava funkciju postojećih sinapsi bez utjecaja na njihov broj. Uzevši sve obzir, čini se da SynCAM 1 i neuroligin 1 zajedno djeluju u formiranju novih, funkcionalnih sinaptičkih veza.[64]

Naši rezultati potvrdili su važnost rane ekspresije SynCAM-a 1 i neuroligina 1 kod formiranja sinaptičkih veza budući da naše stanice od početka u citoplazmi pokazuju difuznu ekspresiju ovih sinaptičkih proteina, a koja od trećeg dana diferencijacije poprima jasni točkasti uzorak. Analizom naših rezultata došli smo do zaključka kako navedene nakupine proteina predstavljaju dvije glavne grupe – nakupine smještene na mjestima novostvorenih sinaptičkih kontakata te mobilne ne-sinaptičke nakupine proteina koje omogućavaju brzu dopremu već formiranih proteinskih kompleksa na mjesto buduće sinapse.[67,68,69,70]

Za razliku od neuroligina i SynCAM-a koji su važni u inicijalnoj fazi formiranja sinapsi, PSD95 igra važnu ulogu kod daljnjeg sinaptičkog sazrijevanja.[71] PSD95 inducira nakupljanje niza neurotransmitorskih receptora i strukturnih proteina na mjesto budućih sinapsi [72], a putem

djelovanja na nakupljanje neuroligina 1 ima direktan utjecaj na ravnotežu između ekscitatornih i inhibitornih sinapsi.[73]

Naše stanice tijekom diferencijacije pokazuju sličnu sinaptičku ekspresiju PSD95 kao i neuroligina i SynCAM-a. U početku je PSD95 u ŽMS raspoređen difuzno da bi postepeno poprimio točkasti uzorak važan za sinaptičko povezivanje.

Uz navedene postsinaptičke proteine analizirali smo i izražaj važnog presinaptičkog proteina Synapsina 1. Synapsin 1 ima važnu ulogu kod transporta i egzocitoze sinaptičkih mjehurića čime omogućava oslobađanje neurotransmitora.[74,75] Njegov signal tijekom diferencijacije postepeno raste što je karakteristično i za ostale sinaptičke proteine, ali s tom razlikom da se njegov signal prati na aksonu.

## **5.2. Obilježavanje živčanih matičnih stanica i utjecaj obilježavanja na njihova svojstva**

Matične stanice možemo obilježiti egzogenim ili endogenim obilježivačima. U ovom istraživanju smo koristili oba pristupa, a svaki od njih ima svoje osobitosti.

Endogeno su stanice bile obilježene žutim fluorescentnim proteinom. Transplantirane su stanice podrijetlom iz transgenične B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J mišje linije koja u oko 20% neurona konstitutivno eksprimira YFP (naši neobjavljeni rezultati). Time smo mogli vjerno pratiti i procijeniti udio transplantiranih ŽMS diferenciranih u neurone.

Egzogeno smo stanice obilježili PKH26 ili BrdU-om. PKH26 boja je lipofilna boja koja već nakon kratke inkubacije stanica pokazuje visoki postotak obojanih stanica bez citotoksičnog učinka (>90%). Budući da se ova boja veže za membranu, a ne za DNA, nema značajniji utjecaj na biološke procese u stanici. S druge strane očiti nedostatak egzogenih obilježivača, vidljiv naročito kod transplantacijskih studija, je relativno slab signal u odnosu na jak pozadinski signal oštećenog tkiva. Proliferacijom i diferencijacijom stanica signal dalje slabi tako da praćenje transplantiranih stanica u jednom trenutku postaje nemoguće.

Za razliku od PKH26, BrdU se veže direktno za molekulu DNA te mijenja proliferacijsku i diferencijacijsku sposobnost ŽMS. Proliferacijsku sposobnost smanjuje, a diferencijacijsku skreće prema gliogenezi, povećavajući udio diferenciranih astrocita na račun neurona. Osim toga, BrdU daje manji postotak obojanih stanica u odnosu na PKH26, oko 70-80%. Usprkos navedenim nedostacima velika prednost BrdU-a, pogotovo kod transplantacijskih studija, je veoma jak signal vidljiv i četiri tjedna nakon transplantacije. Ovaj signal omogućava jasno raspoznavanje transplantiranih stanica od okoline i njihovo dugotrajno praćenje.

### **5.3. Transplantacija živčanih matičnih stanica u oštećeno i zdravo tkivo**

Naši rezultati su pokazali da su stanice transplantirane u postishemijsko tkivo sposobne preživjeti u takvim uvjetima, no broj stanica na mjestu ozljede kao i stupanj njihove integracije kroz diferencijaciju i sinaptičko povezivanje pritom jako ovisi o samom mjestu transplantacije.

#### **5.3.1. Transplantacija živčanih matičnih stanica u corpus callosum**

Stanice transplantirane u corpus callosum (CC) preživljavaju te migriraju duž kalozalnih vlakana u zdravom i u oštećenom tkivu. Fenomen migracije je dosada pokazan u nizu istraživanja te se povezuje s ekspresijom integrinskih receptora na površini stanica koji ulaze u interakciju s okolnim ekstracelularnim matriksom.[76,77,78]

U oštećenom tkivu je migracija jače izražena prema ozljedi što se pak povezuje s određenim proupalnim medijatorima poput CXCL12 te receptorima za kemokine izraženim na površini MS poput CXCR4.[79,80] Usprkos takvoj migraciji usmjerenoj prema ozljedi, broj stanica koje se nakon 4 tjedna mogu naći u oštećenom području je malen, a stanice su uglavnom smještene u penumbri.

### **5.3.2. Transplantacija živčanih matičnih stanica intracerebroventrikularno**

Stanice transplantirane intracerebroventrikularno (ICV) preživljavaju u velikom broju u zdravom i u oštećenom tkivu, no zadržavaju se uglavnom u komorama. Tek jedan mali dio stanica prelazi u tkivo i to kod ozlijeđenog miša. Razlog dobrog preživljenja stanica može biti u faktorima prisutnim u cerebrospinalnom likvoru koji djeluju trofički na stanice, a prisutni su u zdravom i bolesnom likvoru.[81]

Osim što uspješno preživljavaju, stanice se u komorama i diferenciraju pokazujući jak izražaj zrelih markera neurona poput Map2 i Thy1.

### **5.3.3. Transplantacija živčanih matičnih stanica u striatum**

Od svih testiranih pristupa, transplantacija stanica direktno u mjesto ozljede je pokazala daleko najveći broj stanica smještenih u oštećenom tkivu. Zbog toga smo odlučili učiniti detaljnu analizu stupnja preživljenja, diferencijacije i sinaptičkog povezivanja upravo tih transplantata.

Premda su neka dosadašnja istraživanja navodila potencijalno destruktivni utjecaj upale na transplantirane stanice, naše istraživanje je pokazalo da upala ima i pozitivni učinak na transplantirane stanice. Ovo je istraživanje pokazalo 2-3 puta veće preživljenje stanica u postishemijskom tkivu nego kad su transplantirane na isto mjesto u zdravo tkivo. Osim toga, one su se uspješno diferencirale i proizvodile sinaptičke proteine. Postotak diferenciranih neurona odnosno astrocita u transplantatu se nije razlikovao u odnosu na zdravo tkivo upućujući na potencijalnu predodređenost stanica da se diferenciraju u određene vrste stanica, a manje na mogući utjecaj okoline.

Uzrok većeg broja transplantiranih stanica u oštećenom tkivu sigurno ne leži u povećanoj proliferaciji obzirom da je broj Ki67 pozitivnih stanica bio jednak u zdravom i bolesnom tkivu. Razloge možemo tražiti u određenim kategorijama čimbenika rasta prisutnih u oštećenom tkivu koji djeluju trofički na stanice, te tako smanjuju njihovo odumiranje.[82,83,84]



## **5.4. Reaktivne promjene u postishemijskom moždanom tkivu**

Naši rezultati potvrdili su dinamične promjene u postishemijskom moždanom tkivu te pokazali prisutnost nekoliko različitih zbivanja od kojih svaki na sebi svojstven način doprinosi oporavku tkiva.

### **5.4.1. Reaktivna gliozna i angiogeneza**

U području oko jezgre ozljede nastaje hipertrofični astrocitni ožiljak. Povoljan učinak reaktivnih astrocita u smislu ograničavanja širenja upale te smanjivanja propusnosti oštećenih krvnih žila pokazan je u već nekoliko dosadašnjih istraživanja.[85,86,87] Uz gliogenezu odvija se i intenzivan proces angiogeneze potvrđene anti-laminin protutijelom usmjerenim na bazalnu membranu.[88]

### **5.4.2. Ponovni rast aksona**

Aksoni oštećeni ozljedom se prvo povlače iz same jezgre ozljede, da bi se na rubovima ozljede pojavile naznake njihovog ponovnog izrastanja. Na nekim mjestima pojedini aksoni čak uspijevaju i premostiti ozljedu. Kao biljeg rasta aksona koristili smo GAP43 budući da je niz istraživanja, uključujući i neka naša, potvrdio njegovu ključnu ulogu kod rasta aksona.[89,90]

GAP43 regulira metaboličke odgovore zadužene za inicijaciju aksonalnog rasta, a njegova važnost je dodatno potvrđena i eksperimentima u kojima pojačan izražaj GAP43 čak i u fibroblastima, može dovesti do rasta nastavaka sličnih neuritima. GAP43 ima visok izražaj tijekom ranog razvoja dok su kod odraslih prisutne niže razine izražaja ovog gena.

### **5.4.3. Proliferacija endogenih živčanih matičnih stanica**

Analiza tkiva oštećenog moždanim udarom je pokazala prisutnost proliferacijskog odgovora endogenih progenitora. Tako smo redovito nalazili mnoštvo nestin pozitivnih stanica raspoređenih po cijeloj površini od subventrikularne zone pa sve do ruba ozljede.

Navedenu postishemijsku proliferaciju MS je dosada potvrdilo već nekoliko studija.[91,92,93] Istraživanja uglavnom navode da je takva proliferacija kratkotrajna, te da njen vrhunac nastupa oko sedmog dana.

Novonastale stanice potom polagano migriraju iz SVZ prema striatumu i korteksu gdje postepeno sazrijevaju u zrele živčane stanice.[94,95,96] Migraciji u prilog govore i naši rezultati obzirom na široku rasprostranjenost MS u tkivu od SVZ pa sve do ruba ozljede.

### **5.4.4. Rast izražaja sinaptičkih biljega**

Do sada je učinjeno tek nekoliko studija koje su proučavale izražaj sinaptičkih markera u postishemijskom moždanom tkivu. Većina njih govori u prilog reaktivnom pojačanju izražaja sinaptičkih proteina ističući moždanu plastičnost kao mogući mehanizam oporavka tkiva od ishemijske ozljede.[97,98].

U skladu s time, i naši su rezultati pokazali veliki porast u izražaju sinaptičkih proteina u postishemijskom tkivu. Taj je porast uglavnom nađen u regiji pokraj same jezgre ozljede te u kontralateralnoj hemisferi u području analognom ozlijeđenom području. Osim navedenoga, novonastali progenitori u ozlijeđenom hipokampusu kao i u penumbri također pokazuju intenzivnu proizvodnju sinaptičkih proteina potvrđujući svoju sposobnost za sinaptičko povezivanje.

## 6. Zaključci

**1. Živčane matične stanice u *in vitro* uvjetima se uspješno diferenciraju i sinaptički povezuju.**

ŽMS izolirane iz embrionalnog stadija E14,5 se u kulturi bez dodanih faktora rasta uspješno diferenciraju. Nakon tjedan dana diferencijacije se opaža 70% neurona i 5% astrocita. Ostatak su nediferencirane stanice. Istovremeno u kulturi raste i izražaj sinaptičkih biljega (neuroligin 1, SynCAM 1, Synapsin 1 i PSD95). Uzorak njihovog izražaja upućuje na aktivan proces sinaptičkog povezivanja u kulturi.

**2. Obilježavanje živčanih matičnih stanica BrdU-om je pogodnije za praćenje ŽMS nakon transplantacije u odnosu na PKH26.**

Obilježavanje ŽMS pomoću PKH26 dovodi do visokog postotka PKH26+ stanica, no njihov signal slabi proliferacijom i diferencijacijom te nakon 3-5 tjedana postaje preslab za *in vivo* praćenje pojedinačnih stanica. Obilježavanje ŽMS BrdU-om utječe na osnovna obilježja ŽMS tako što smanjuje njihovu proliferaciju i diferencijaciju u neurone, no signal obilježenih ŽMS je dovoljno jak za praćenje stanica u transplantacijskim studijama.

**3. Transplantacija živčanih matičnih stanica u ozlijeđeni striatum je pokazala bolje rezultate u odnosu na transplantaciju u moždane komore i corpus callosum.**

Živčane matične stanice transplantirane u striatum pokazuju najveći broj preživjelih stanica na mjestu ozljede, te se ova metoda preporučuje kao mjesto izbora za terapijsku transplantaciju.

Živčane matične stanice transplantirane u lateralne komore formiraju neurosfere u kojima se djelomično i diferenciraju, a jedan dio stanica migrira iz likvora natrag u tkivo. Živčane matične stanice transplantirane u corpus callosum migriraju duž vlakna na obje strane, s nešto jačom migracijom prema ozlijeđenoj strani. I kod jednog i kod drugog mjesta transplantacije nije zamijećeno značajnije nakupljanje stanica na mjestu ozljede.

#### **4. Postishemijska upalna zbivanja u striatumu djeluju na transplantirane stanice tako da povećavaju njihovo preživljenje dok istovremeno ne mijenjaju njihovu sposobnost za diferencijaciju i sinaptičko povezivanje.**

Stanice transplantirane u ozlijeđeni striatum pokazuju 2-3 puta veće preživljenje u odnosu na preživljenje vidljivo kada su stanice transplantirane na isto mjesto u zdravog miša. Diferencijacija transplantiranih stanica u neurone i astrocite, kao i njihova pozitivnost za sinaptičke biljege: SynCAM 1, PSD95 i neuroligin 1 se ne razlikuje značajnije u ozlijeđenom i zdravom striatumu.

#### **5. Oporavak postishemijskog moždanog tkiva obilježen je nizom reaktivnih promjena.**

Nakon nastanka moždanog udara se u tkivu nalaze hipertrofija i reaktivna proliferacija astrocita, angiogeneza te proliferacija endogenih progenitora. Također se nalazi i urastanje aksona u mjesto ozljede. Značajan porast izražaja sinaptičkih biljega, i to u nastavcima aksona te novostvorenim progenitorima ukazuje na veliku plastičnost moždanog tkiva.

## 7. Sažetak

Ishemijski moždani udar je vodeći uzrok smrti i dugotrajne invalidnosti u svijetu. Osnovni uzrok takvog stanja jest gotovo potpuni nedostatak učinkovite ciljane terapije. Tehnologija matičnih stanica (MS) je u dosadašnjim pretkliničkim i kliničkim studijama pokazala velik potencijal u tretiranju neuroloških bolesti. Unatoč tome, još uvijek se malo zna o tome što se događa s MS nakon transplantacije u tkivo zahvaćeno moždanom ishemijom.

Kako bismo istražili post-transplantacijska zbivanja, te testirali hipotezu kako moždana ishemija smanjuje preživljenje MS, ali ubrzava diferencijaciju i nastanak sinaptičkih spojeva, transplantirali smo živčane matične stanice (ŽMS) u moždano tkivo zahvaćeno ishemijom. Usporedba sa stanicama transplantiranim u zdravu kontrolu te in vitro uvjetima dala je detaljan uvid u preživljenje i diferencijaciju stanica te nastanak sinaptičkih spojeva. Rezultati su pokazali da ŽMS transplantirane u ozlijeđeno tkivo preživljavaju u 2-3 puta većem broju u takvom tkivu u odnosu na zdravo, a da se pritom udio transplantiranih ŽMS diferenciranih u neurone i astrocite u ozlijeđenom i zdravom tkivu međusobno ne razlikuje. Usporedba striatuma, lateralnih komora i corpus callosuma je pokazala da je striatum najpogodnije mjesto za terapijsku transplantaciju stanica, te ga zbog dopremanja najvećeg broja stanica u područje ozljede predlažemo kao anatomske mjesto izbora.

Iz navedenih rezultata zaključujemo kako preživljenje ŽMS ovisi o uvjetima tkiva u koje se transplantiraju. Istovremeno, diferencija i sinaptičko povezivanje ŽMS primarno ovise o samim stanicama, a manje o okolini u koju su transplantirane. Ovi rezultati daju unaprijeđen uvid u utjecaj upale na transplantirane stanice, a opisano preživljenje, diferencijacija i sinaptičko povezivanje transplantiranih stanica u ozlijeđenom tkivu ukazuju na moguće mehanizme terapijskog učinka ŽMS kod ishemijskog moždanog udara.

## 8. Summary

Ischemic brain stroke is a leading cause of mortality and chronic disability in the world. In spite of gradual advances in the field of stroke therapy, current treatment options are still quite limited. Stem cell research has so far shown great promise in a number of preclinical and clinical studies for treatment of neurologic diseases. However, there are still many questions about events occurring after transplantation of stem cells in the brain affected by ischemia.

In order to analyze posttransplantation events and test the hypothesis that brain ischemia decreases survival of stem cells, but accelerates differentiation and synaptogenesis, we transplanted neural stem cells (NSC) into postischemic brain tissue. Comparison with its healthy counterpart events gave us insight in NSC survival, differentiation and synaptic integration. Our results show that NSC survival in the ischemic tissue is 2 to 3 times greater relative to the healthy control, while their differentiation into neurons or astrocytes doesn't significantly differ between the injured and healthy tissue. Direct comparison between the striatum, lateral ventricles and corpus callosum suggested that the optimal anatomic position for stem cell transplantation is the striatum considering the greatest number of cells that are delivered to the injured tissue through this approach.

From these results we conclude that the survival of NSCs depends on the tissue conditions where they are transplanted. At the same time, their differentiation and synaptic integration primarily depend on the cells themselves and not on the surrounding environment. These results give us a more detailed insight into the influence of inflammation on transplanted cells and indicate potential mechanisms of NSC therapeutic action in the ischemic brain.

## 9. Popis literature

- [1] Little M-T, Storb R. History of haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Cancer* 2002;2(3):231–8.
- [2] Reubinoff BE, Pera MF, Fong C-Y, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotech* 2000;18(4):399–404.
- [3] Wert G de, Mummery C. Human embryonic stem cells: research, ethics and policy. *Hum Reprod* 2003;18(4):672–82.
- [4] Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J, Zucker JP, et al. Derivation of Embryonic Stem-Cell Lines from Human Blastocysts. *New England Journal of Medicine* 2004;350(13):1353–6.
- [5] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocyst. *Science* 1998;282(5391):1145–7.
- [6] Labosky PA, Barlow DP, Hogan BL. Mouse embryonic germ (EG) cell lines: transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (Igf2r) gene compared with embryonic stem (ES) cell lines. *Development* 1994;120(11):3197–204.
- [7] Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 1992;359(6395):550–1.
- [8] Wobus AM, Boheler KR. Embryonic Stem Cells: Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy. *Physiological Reviews* 2005;85(2):635–78.

- [9] O'Donoghue K, Fisk NM. Fetal stem cells. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 2004;18(6):853–75.
- [10] Kaufman MH, Bard J. *The Anatomical Basis of Mouse Development*. Gulf Professional Publishing; 1999. 312 p.
- [11] Villa A, Snyder EY, Vescovi A, Martínez-Serrano A. Establishment and Properties of a Growth Factor-Dependent, Perpetual Neural Stem Cell Line from the Human CNS. *Experimental Neurology* 2000;161(1):67–84.
- [12] Alvarez CV, Garcia-Lavandeira M, Garcia-Rendueles MER, Diaz-Rodriguez E, Garcia-Rendueles AR, Perez-Romero S, et al. Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells. *J Mol Endocrinol* 2012 ;49(2):R89–111.
- [13] De la Fuente R, Abad JL, García-Castro J, Fernández-Miguel G, Petríz J, Rubio D, et al. Dedifferentiated adult articular chondrocytes: a population of human multipotent primitive cells. *Experimental Cell Research* 2004;297(2):313–28.
- [14] Li L, Clevers H. Coexistence of Quiescent and Active Adult Stem Cells in Mammals. *Science* 2010;327(5965):542–5.
- [15] Bjornsson CS, Apostolopoulou M, Tian Y, Temple S. It Takes a Village: Constructing the Neurogenic Niche. *Developmental Cell* 2015;32(4):435–46.
- [16] Xu X, Yi F, Pan H, Duan S, Ding Z, Yuan G, et al. Progress and prospects in stem cell therapy. *Acta Pharmacol Sin* 2013;34(6):741–6.
- [17] Martino G, Pluchino S. The therapeutic potential of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2006;7(5):395–406.



- [18] Bliss T, Guzman R, Daadi M, Steinberg GK. Cell Transplantation Therapy for Stroke. *Stroke* 2007;38(2):817–26.
- [19] Hicks AU, Lappalainen RS, Narkilahti S, Suuronen R, Corbett D, Sivenius J, et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural precursor cells and enriched environment after cortical stroke in rats: cell survival and functional recovery. *European Journal of Neuroscience* 2009;29(3):562–74.
- [20] Andres RH, Choi R, Steinberg GK, Guzman R. Potential of adult neural stem cells in stroke therapy. *Regenerative Medicine* 2008;3(6):893–905.
- [21] Borlongan CV, Hadman M, Sanberg CD, Sanberg PR. Central Nervous System Entry of Peripherally Injected Umbilical Cord Blood Cells Is Not Required for Neuroprotection in Stroke. *Stroke* 2004;35(10):2385–9.
- [22] Mitrečić D. Current advances in intravascular administration of stem cells for neurological diseases: a new dose of rejuvenation injected. *Rejuvenation Res* 2011;14(5):553–5.
- [23] Jin K, Sun Y, Xie L, Mao XO, Childs J, Peel A, et al. Comparison of ischemia-directed migration of neural precursor cells after intrastriatal, intraventricular, or intravenous transplantation in the rat. *Neurobiology of Disease* 2005;18(2):366–74.
- [24] Bühnemann C, Scholz A, Bernreuther C, Malik CY, Braun H, Schachner M, et al. Neuronal differentiation of transplanted embryonic stem cell-derived precursors in stroke lesions of adult rats. *Brain* 2006;129(12):3238–48.
- [25] Daadi MM, Li Z, Arac A, Grueter BA, Sofilos M, Malenka RC, et al. Molecular and Magnetic Resonance Imaging of Human Embryonic Stem Cell–Derived Neural Stem Cell Grafts in Ischemic Rat Brain. *Mol Ther* 2009;17(7):1282–91.

- [26] Ishibashi S, Sakaguchi M, Kuroiwa T, Yamasaki M, Kanemura Y, Shizuko I, et al. Human neural stem/progenitor cells, expanded in long-term neurosphere culture, promote functional recovery after focal ischemia in Mongolian gerbils. *J Neurosci Res* 2004;78(2):215–23.
- [27] Chia PH, Li P, Shen K. Cellular and molecular mechanisms underlying presynapse formation. *J Cell Biol* 2013;203(1):11–22.
- [28] Sabo SL, Gomes RA, McAllister AK. Formation of Presynaptic Terminals at Predefined Sites along Axons. *J Neurosci* 2006;26(42):10813–25.
- [29] Washbourne P, Dityatev A, Scheiffele P, Biederer T, Weiner JA, Christopherson KS, et al. Cell Adhesion Molecules in Synapse Formation. *J Neurosci* 2004;24(42):9244–9.
- [30] Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 1962;59(3):223–39.
- [31] Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, Wallace M, et al. Imaging Neuronal Subsets in Transgenic Mice Expressing Multiple Spectral Variants of GFP. *Neuron* 2000 ;28(1):41–51.
- [32] Nguyen QT, Sanes JR, Lichtman JW. Pre-existing pathways promote precise projection patterns. *Nat Neurosci* 2002;5(9):861–7.
- [33] Chen YS, Chung SSM, Chung SK. Noninvasive Monitoring of Diabetes-Induced Cutaneous Nerve Fiber Loss and Hypoalgesia in thy1-YFP Transgenic Mice. *Diabetes* 2005;54(11):3112–8.
- [34] Porrero C, Rubio-Garrido P, Avendaño C, Clascá F. Mapping of fluorescent protein-expressing neurons and axon pathways in adult and developing Thy1-eYFP-H transgenic mice. *Brain Research* 2010;1345:59–72.

- [35] Vidal M, Morris R, Grosveld F, Spanopoulou E. Tissue-specific control elements of the Thy-1 gene. *EMBO J* 1990(3):833–40.
- [36] Chishima T, Miyagi Y, Wang X, Yamaoka H, Shimada H, Moossa AR, et al. Cancer Invasion and Micrometastasis Visualized in Live Tissue by Green Fluorescent Protein Expression. *Cancer Res* 1997;57(10):2042–7.
- [37] Parish CR. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol Cell Biol* 1999;77(6):499–508.
- [38] Horan PK, Slezak SE. Stable cell membrane labelling. *Nature* 1989;340(6229):167–8.
- [39] Sacco RL, Wolf PA, Gorelick PB. Risk factors and their management for stroke prevention: outlook for 1999 and beyond. *Neurology* 1999;53(7 Suppl 4):S15–24.
- [40] Del Zoppo GJ, Poeck K, Pessin MS, Wolpert SM, Furlan AJ, Ferbert A, et al. Recombinant tissue plasminogen activator in acute thrombotic and embolic stroke. *Ann Neurol* 1992;32(1):78–86.
- [41] Li F, Han SS, Tatlisumak T, Liu K-F, Garcia JH, Sotak CH, et al. Reversal of acute apparent diffusion coefficient abnormalities and delayed neuronal death following transient focal cerebral ischemia in rats. *Ann Neurol* 1999;46(3):333–42.
- [42] Sicard KM, Fisher M. Animal models of focal brain ischemia. *Experimental & Translational Stroke Medicine* 2009;1(1):7.
- [43] Meng X, Fisher M, Shen Q, Sotak CH, Duong TQ. Characterizing the diffusion/perfusion mismatch in experimental focal cerebral ischemia. *Ann Neurol* 2004;55(2):207–12.
- [44] Wilhelmsson U, Bushong EA, Price DL, Smarr BL, Phung V, Terada M, et al. Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *PNAS* 2006;103(46):17513–8.

- [45] Sofroniew MV. Reactive Astrocytes in Neural Repair and Protection. *Neuroscientist* 2005;11(5):400–7.
- [46] Font MA, Arboix A, Krupinski J. Angiogenesis, Neurogenesis and Neuroplasticity in Ischemic Stroke. *Curr Cardiol Rev* 2010;6(3):238–44.
- [47] Busch SA, Horn KP, Cuascut FX, Hawthorne AL, Bai L, Miller RH, et al. Adult NG2+ Cells are Permissive to Neurite Outgrowth and Stabilize Sensory Axons During Macrophage-Induced Axonal Dieback After Spinal Cord Injury. *J Neurosci* 2010 ;30(1):255.
- [48] Kondziolka D, Wechsler L, Goldstein S, Meltzer C, Thulborn KR, Gebel J, et al. Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. *Neurology* 2000;55(4):565–9.
- [49] Theiler K. *The House Mouse*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1989.
- [50] Belayev L, Busto R, Zhao W, Fernandez G, Ginsberg MD. Middle cerebral artery occlusion in the mouse by intraluminal suture coated with poly-L-lysine: neurological and histological validation. *Brain Res* 1999;833(2):181–90.
- [51] Kriegstein AR, Götz M. Radial glia diversity: A matter of cell fate. *Glia* 2003;43(1):37–43.
- [52] Fietz SA, Huttner WB. Cortical progenitor expansion, self-renewal and neurogenesis—a polarized perspective. *Current Opinion in Neurobiology* 2011;21(1):23–35.
- [53] Fietz SA, Lachmann R, Brandl H, Kircher M, Samusik N, Schröder R, et al. Transcriptomes of germinal zones of human and mouse fetal neocortex suggest a role of extracellular matrix in progenitor self-renewal *PNAS*. 2012;109(29):11836–41.
- [54] Lobo MVT, Alonso FJM, Redondo C, López-Toledano MA, Caso E, Herranz AS, et al. Cellular Characterization of Epidermal Growth Factor-expanded Free-floating Neurospheres. *J Histochem Cytochem* 2003;51(1):89–103.

- [55] Tropepe V, Sibia M, Ciruna BG, Rossant J, Wagner EF, van der Kooy D. Distinct Neural Stem Cells Proliferate in Response to EGF and FGF in the Developing Mouse Telencephalon. *Developmental Biology* 1999;208(1):166–88.
- [56] Lillien L, Raphael H. BMP and FGF regulate the development of EGF-responsive neural progenitor cells. *Development* 2000;127(22):4993–5005.
- [57] Imura T, Kornblum HI, Sofroniew MV. The Predominant Neural Stem Cell Isolated from Postnatal and Adult Forebrain But Not Early Embryonic Forebrain Expresses GFAP. *J Neurosci* 2003;23(7):2824–32.
- [58] Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo J-M, Alvarez-Buylla A. EGF Converts Transit-Amplifying Neurogenic Precursors in the Adult Brain into Multipotent Stem Cells. *Neuron* 2002;36(6):1021–34.
- [59] He F, Ge W, Martinowich K, Becker-Catania S, Coskun V, Zhu W, et al. A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astrogliogenesis. *Nat Neurosci* 2005;8(5):616–25.
- [60] Obayashi S, Tabunoki H, Kim SU, Satoh J. Gene Expression Profiling of Human Neural Progenitor Cells Following the Serum-Induced Astrocyte Differentiation. *Cell Mol Neurobiol* 2009;29(3):423–38.
- [61] Bonni A, Sun Y, Nadal-Vicens M, Bhatt A, Frank DA, Rozovsky I, et al. Regulation of Gliogenesis in the Central Nervous System by the JAK-STAT Signaling Pathway. *Science* 1997;278(5337):477–83.
- [62] Nagao M, Sugimori M, Nakafuku M. Cross Talk between Notch and Growth Factor/Cytokine Signaling Pathways in Neural Stem Cells. *Mol Cell Biol* 2007;27(11):3982–94.
- [63] McAllister AK. Dynamic Aspects of Synapse Formation. *Annu Rev Neurosci* 2007;30:425–50.

- [64] Sara Y, Biederer T, Atasoy D, Chubykin A, Mozhayeva MG, Südhof TC, et al. Selective Capability of SynCAM and Neuroligin for Functional Synapse Assembly. *J Neurosci* 2005;25(1):260–70.
- [65] Scheiffele P, Fan J, Choih J, Fetter R, Serafini T. Neuroligin Expressed in Nonneuronal Cells Triggers Presynaptic Development in Contacting Axons. *Cell* 2000;101(6):657–69.
- [66] Biederer T, Sara Y, Mozhayeva M, Atasoy D, Liu X, Kavalali ET, et al. SynCAM, a Synaptic Adhesion Molecule That Drives Synapse Assembly. *Science* 2002;297(5586):1525–31.
- [67] Gerrow K, Romorini S, Nabi SM, Colicos MA, Sala C, El-Husseini A. A Preformed Complex of Postsynaptic Proteins Is Involved in Excitatory Synapse Development. *Neuron* 2006;49(4):547–62.
- [68] Sans N, Prybylowski K, Petralia RS, Chang K, Wang Y-X, Racca C, et al. NMDA receptor trafficking through an interaction between PDZ proteins and the exocyst complex. *Nat Cell Biol* 2003;5(6):520–30.
- [69] Waites CL, Craig AM, Garner CC. Mechanisms of Vertebrate Synaptogenesis. *Annual Review of Neuroscience* 2005;28(1):251–74.
- [70] Rao A, Kim E, Sheng M, Craig AM. Heterogeneity in the molecular composition of excitatory postsynaptic sites during development of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 1998;18(4):1217–29.
- [71] Kim E, Sheng M. PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 2004;5(10):771–81.
- [72] El-Husseini AE-D, Schnell E, Chetkovich DM, Nicoll RA, Brecht DS. PSD-95 Involvement in Maturation of Excitatory Synapses. *Science* 2000;290(5495):1364–8.
- [73] Levinson JN, Chéry N, Huang K, Wong TP, Gerrow K, Kang R, et al. Neuroligins Mediate Excitatory and Inhibitory Synapse Formation INVOLVEMENT OF PSD-95 AND NEUREXIN-1 $\beta$  IN NEUROLIGIN-INDUCED SYNAPTIC SPECIFICITY. *J Biol Chem* 2005;280(17):17312–9.

- [74] Evergren E, Benfenati F, Shupliakov O. The synapsin cycle: A view from the synaptic endocytic zone. *J Neurosci Res* 2007;85(12):2648–56.
- [75] Hilfiker S, Pieribone VA, Czernik AJ, Kao H-T, Augustine GJ, Greengard P. Synapsins as regulators of neurotransmitter release. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 1999;354(1381):269–79.
- [76] Wolfenson H, Lavelin I, Geiger B. Dynamic Regulation of the Structure and Functions of Integrin Adhesions. *Developmental Cell* 2013;24(5):447–58.
- [77] Flanagan LA, Rebaza LM, Derzic S, Schwartz PH, Monuki ES. Regulation of human neural precursor cells by laminin and integrins. *J Neurosci Res* 2006;83(5):845–56.
- [78] Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002;110(6):673–87.
- [79] Chen C-C, Hsu Y-H, Jayaseema DM, Chen J-Y, Hueng D-Y, Chang C. White matter tracts for the trafficking of neural progenitor cells characterized by cellular MRI and immunohistology: the role of CXCL12/CXCR4 signaling. *Brain Struct Funct* 2014;1–13.
- [80] Chen Q, Zhang M, Li Y, Xu D, Wang Y, Song A, et al. CXCR7 Mediates Neural Progenitor Cells Migration to CXCL12 Independent of CXCR4. *Stem Cells* 2015
- [81] Zappaterra MD, Lisgo SN, Lindsay S, Gygi SP, Walsh CA, Ballif BA. A Comparative Proteomic Analysis of Human and Rat Embryonic Cerebrospinal Fluid. *J Proteome Res* 2007;6(9):3537–48.
- [82] Newman MB, Willing AE, Manresa JJ, Davis-Sanberg C, Sanberg PR. Stroke-induced Migration of Human Umbilical Cord Blood Cells: Time Course and Cytokines. *Stem Cells and Development* 2005;14(5):576–86.
- [83] Kokaia Z, Martino G, Schwartz M, Lindvall O. Cross-talk between neural stem cells and immune cells: the key to better brain repair? *Nat Neurosci* 2012;15(8):1078–87.
- [84] Darsalia V, Allison SJ, Cusulin C, Monni E, Kuzdas D, Kallur T, et al. Cell number and timing of transplantation determine survival of human neural stem cell grafts in stroke-damaged rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011;31(1):235–42.

- [85] Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 2010;119(1):7–35.
- [86] Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostendorf T, Svendsen CN, et al. Leukocyte Infiltration, Neuronal Degeneration, and Neurite Outgrowth after Ablation of Scar-Forming, Reactive Astrocytes in Adult Transgenic Mice. *Neuron* 1999;23(2):297–308.
- [87] Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences* 2009;32(12):638–47.
- [88] Beck H. Molecular Mechanisms of Post-Ischemic Angiogenesis in the Brain. In: Slevin M, editor. *Therapeutic Angiogenesis for Vascular Diseases* [Internet]. Springer Netherlands; 2010 p. 115–43.
- [89] Benowitz LI, Routtenberg A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends in Neurosciences* 1997;20(2):84–91.
- [90] Grasselli G, Strata P. Structural plasticity of climbing fibers and the growth-associated protein GAP-43. *Front Neural Circuits* 2013;7:25.
- [91] Tobin MK, Bonds JA, Minshall RD, Pelligrino DA, Testai FD, Lazarov O. Neurogenesis and inflammation after ischemic stroke: what is known and where we go from here. *J Cereb Blood Flow Metab* 2014;34(10):1573–84.
- [92] Lichtenwalner RJ, Parent JM. Adult neurogenesis and the ischemic forebrain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;26(1):1–20.
- [93] Tonchev AB, Yamashima T, Sawamoto K, Okano H. Enhanced proliferation of progenitor cells in the subventricular zone and limited neuronal production in the striatum and neocortex of adult macaque monkeys after global cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 2005;81(6):776–88.
- [94] Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 2002;8(9):963–70.



- [95] Zhang RL, Chopp M, Gregg SR, Toh Y, Roberts C, LeTourneau Y, et al. Patterns and dynamics of subventricular zone neuroblast migration in the ischemic striatum of the adult mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009;29(7):1240–50.
- [96] Parent JM, Vexler ZS, Gong C, Derugin N, Ferriero DM. Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann Neurol* 2002;52(6):802–13.
- [97] Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE. Neocortical Neural Sprouting, Synaptogenesis, and Behavioral Recovery After Neocortical Infarction in Rats. *Stroke* 1995;26(11):2135–44.
- [98] Carmichael ST. Plasticity of Cortical Projections after Stroke. *Neuroscientist* 2003;9(1):64–75.

## 10. Životopis

Rođena je 28. kolovoza 1985. godine u Zagrebu, gdje je završila osnovnu školu i gimnaziju. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2004. godine i na istom je diplomirala 2010. godine. Dobitnica je Dekanove nagrade za uspjeh u akademskoj godini 2004./05. Nakon odrađenog liječničkog staža za KBC Zagreb, u studenom 2011. godine položila je državni ispit te stekla odobrenje za samostalan rad.

Od 2011 do 2014. godine je bila zaposlena kao znanstveni suradnik na projektu doc. dr. sc. Dinka Mitrečića „Inovativni pristup liječenju moždanog udara presađivanjem živčanih matičnih stanica i inhibicijom molekularnog puta Hmgb1-Tlr2-NfκB“, HRZZ 02.05/40. Tijekom tog perioda sudjelovala je u radu nekoliko međunarodnih laboratorija, a suradnja s Institutom u Pragu rezultirala je publikacijom o novoj ulozi Nop2 gena u odraslom mozgu. Uz to sudjelovala je aktivno u provođenju dodiplomske nastave na Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.. U svibnju 2014. godine započela je sa specijalizacijom ginekologije i porodništva u KBC Zagreb. U listopadu 2011. godine upisuje poslijediplomski studij “Neuroznanost” na Medicinskom fakultetu u Zagrebu.

Prvi je autor ili koautor nekoliko znanstvenih članaka, od kojih su 2 indeksirana u Current Contentsu, te više kongresnih priopćenja.

Članica je Hrvatskog društva za neuroznanost te Hrvatskog društva za elektronsku mikroskopiju.